Die zwischenmolekulare Wechselwirkung bei der Hydrolyse von ATP in wäßrigen Lösungen

– eine infrarotspektroskopische Untersuchung –

Klaus Peter Hofmann

1972

Die zwischenmolekulare Wechselwirkung bei der Hydrolyse von ATP in wäßrigen Lösungen - eine infrarotspektroskopische Untersuchung -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Peter Hofmann
aus Eichenau b. München

München 1972

1. Berichterstatter: Dozent Dr.G.Zundel
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rollwagen
Tag der mündlichen Prüfung: 20.Dezember 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1969 bis Dezember 1972 im Institut für Physikalische Chemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Dozent Dr. G. Zundel,
der die Arbeit anregte, möchte ich besonders herzlich für die außerordentliche Förderung danken, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn A. Roehrich danke ich für seine Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Beschaffung von Chemikalien, und Fräulein I.Straub für ihre Hilfe bei der Anfertigung des Manuskripts.

Den Herren F. Reim und E.Rupp möchte ich für die Durchführung schwieriger feinmechanischer Arbeiten danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für finanzielle Förderung.

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Experimentelle Technik	3
2.1	Vorbemerkung	3
2.2	Messung fester Schichten	3
2.2.1	Frühere Methode der Schichtherstellung	3
2.2.2	Versagen der früheren Methode	4
2.2.3	Apparat zur Herstellung reproduzierbarer Schichten	4
2.2.3.1	Konstruktiver Aufbau	5
2.2.3.2	Justierung des Probenträgers	5
2.2.3.3	Zylinderschliff und stabile Lage des Trägers	8
2.2.3.4	Handhabung und Genauigkeit	8
2.3	Messung von Lösungen	9
2.3.1	Küvette mit mechanisch einstellbarer Schichtdicke	10
2.3.2	Küvette mit thermischer Justierung	10
2.3.3	Flüssigkeitsküvette mit konstanter Schicht	12
2.3.3.1	Konstruktiver Aufbau	13
2.3.3.2	Spezifische Fehlerquellen	15
2.3.3.3	Experimentelle Praxis	17
2.4	Allgemeine Fehlerquellen	18
2.4.1	Unterschiedliche Nullextinktion in den beiden Strahlengängen	18
2.4.2	Erwärmung der Vergleichsküvette	18
2.4.3	Schwankung der Schichtdicke über den Strahlquerschnitt	19
2.4.3.1	Die Extinktion als abgeleitete Größe	19
2.4.3.2	Allgemeiner Fall	20
2.4.3.3	Von ebenen Flächen begrenzte Schicht	20
2.4.3.4	Der Fehler bei der Eichung der Schichtdicke	23

		Seite
2.4.3.5	Der zu erwartende Fehler in praktischen Fällen	25
2.5	Spektrometer	27
2.6	Die Substanzen und ihre Herstellung	27
2.6.1	Käufliche Ausgangssubstanzen	27
2.6.2	Herstellung der nicht käuflichen Ausgangssubstanzen	28
2.6.2.1	Herstellung im Ionenaustauscher	28
2.6.2.2	Neutralisation	29
2.6.3	Herstellung der Proben	30
2.6.4	Umrechnung von Konzentrationsangaben	31
2.7	Methoden der Massen- und Konzentrationsbestimmung	32
2.7.1	Wägung und Elementaranalyse	33
2.7.2	UV Methoden	34
2.7.2.1	UV Bande des Adenins	34
2.7.2.2	Enzymatischer Test	34
2.7.3	Gravimetrische K^+ Bestimmung	37
2.7.4	Bestimmung des anorganischen Phosphats	38
3.	Messungen, Befunde und ihre Deutung	40
3.1	Die polarisierbare Wasserstoff-Brücke	40
3.1.1	Die symmetrische H^+ Brücke mit Doppelminimumpotential	40
3.1.2	Unsymmetrische H^+ Brücken mit Doppelminimum	43
3.2	Uebersicht über die durchgeführten Meßreihen	45
3.3	Protonierte Einzelsysteme	46
3.3.1	Protonierung des PO_4^{3-} Ions in wäßriger Lösung	46
3.3.1.1	Die Banden	46
3.3.1.2	Der Verlauf der Kontinuumsabsorption mit der Protonierung	49
3.3.2	Das Na^+ Salz des ADP bzw. ATP	57
3.3.2.1	Die pK_a Werte	57

		Seite
3.3.2.2	Zuordnung der Banden	58
3.3.2.3	Vergleichende Betrachtung von ADP und	60
3.3.2.4	Die Spektren der hydratisierten Schichten	65
3.3.3	Magnesiumkomplex des ADP bzw. ATP	66
3.3.3.1	Bindungskonstante	66
3.3.3.2	Mg^{2+} und Proton	67
3.3.3.3	Bindungsort für das Mg^{2+}	67
3.3.3.4	Die Art der Bindung	70
3.3.3.5	Spektren des ADP Komplexes in Abhängigkeit von der Protonierung	70 70
3.3.4	ADP Magnesiumkomplex und PO_4^{3-} Ion	73
3.4	Die Hydrolyse des MgATP Komplexes	76
3.4.1	Die energiereiche Bindung in thermodynamischer und molekularer Betrachtungsweise	76 76
3.4.2	Die Hydrolyse des ATP^{4-} Ions in wäßriger Lösung	77
3.4.2.1	Allgemeines	77
3.4.2.2	Die bei der Hydrolyse entstehenden Protonen	78
3.4.2.3	Die Verteilung der Protonen	79
3.4.3	Die Messungen und ihre Deutung	80
3.4.3.1	Phosphatgruppen	81
	1. Der Gang mit der Ausgangsprotonierung	81
	2. Die Abhängigkeit vom Hydrolysegrad	88
	3. "pK_a Werte" im Hydrolysesystem	89
3.4.3.2	Die Protonierung der Basenreste	89
	1. Gang mit der Ausgangsprotonierung	90
	2. Abhängigkeit vom Hydrolysegrad	90
	3. Der Zusammenhang mit der Protonierung der Phosphatgruppen	91
3.4.3.3	Die Kontinuumsabsorption	92
	1. Kontinuum durch $POH^+ \cdots O$ Brücken zwischen Phosphationen	92

		Seite
	2. Kontinuum durch $NH^+ \cdots N$ Brükken zwischen den Baseresten	94
3.4.3.4	Veränderungen an den Banden des H_2O	95
4.	Biologische Aspekte	101
	Zusammenfassung	102
	Literatur	105

1. Einleitung

Ueber den Hydrolysevorgang des ATP Systems, das eine sehr wesentliche Rolle in biologischen Prozessen spielt, liegen bisher keine experimentellen Daten vor, die eine Aussage über die molekularen Prozesse dieses Vorganges erlauben. Eine methodische Möglichkeit, solche molekularen Daten zu gewinnen, bietet die quantitative IR Spektroskopie.

Die Erfahrungen von Murr und Zundel (1) (2) haben gezeigt, daß die IR Spektroskopie besonders geeignet ist, Aussagen über die Anion-Kation-Wechselwirkung zu machen. Es ist andererseits bekannt, daß der Mg^{2+} Komplex des ATP das Substrat enzymatischer Vorgänge ist und daß die Wirkung des ATP in der Bioenergetik empfindlich vom Ionenmilieu abhängt. Diese Abhängigkeit mußte sich im IR-Spektrum erkennen lassen.

Weiterhin hatten die Arbeiten von Metzger (3) und Kampschulte -Scheuing (4) ein im IR auftretendes Kontinuum nachgewiesen. Sessler hat die pK_a Bedingungen, unter denen dieses Kontinuum auftritt, näher bestimmt (5). Seine Arbeiten (5) (6) sowie die von Mühlinghaus am Poly L Histidin (7) (8) ließen auch am ATP System eine Kontinuumsabsorption erwarten.

Die Theorie (9) (9a) erklärte das Kontinuum durch extrem polarisierbare Wasserstoff-Brücken und deren intermolekulare Wechselwirkung. Dies soll bedeuten, daß solche Brücken aufeinander weitreichende Kräfte ausüben (10) und daß sie mit benachbarten Anionen und Dipolfeldern von Solvatmolekülen in Wechselwirkung treten (9a). Ferner werden Wechselwirkungen mit zwischenmolekularen Schwingungen diskutiert (9a), vgl. Abschnitt 3.1.

Die genannten Befunde ließen erwarten, daß eine IR Untersuchung einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen

Vorgänge liefern würde, die bei der Uebertragung der freien Energie während der Hydrolyse [+]) und Phosphorylierung [++]) des ATP ablaufen. Insbesondere könnten die polarisierbaren Wasserstoff-Brücken und die freie Energie ihrer Wechselwirkungen auch am Elementarvorgang der Muskelkontraktion beteiligt sein. Neuere Untersuchungen zeigen, daß an die kontraktilen Proteine gebundenes ADP beim Kontraktionsvorgang eine Rolle spielt (10a).

[+]) Z.B. bei aktiven Transportvorgängen, bei der Muskelkontraktion und bei biochemischen Syntheseprozessen

[++]) Z.B. Photophosphorylierung, oxydative Phosphorylierung, biochemische Abbauprozesse

2. Experimentelle Technik

2.1 Vorbemerkung

In dem recht verwickelten Zusammenhang zwischen Ionenmilieu, Hydrolyse, Protonierung und Wasserstruktur sind von zahlreichen Arbeitsgruppen einzelne Komponenten aufgeklärt worden. Davon soll in Kapitel 3 mehr berichtet werden.

Wir wollten durch die quantitative Ausmessung der Kontinuumsabsorption und die parallel laufende quantitative Bestimmung der von Ionen verursachten Intensitätsänderungen der Banden die Möglichkeiten der IR Spektroskopie weitgehend ausschöpfen. Das folgende Kapitel beschreibt die Schwierigkeiten, die bei der IR Untersuchung biologischer Systeme auftreten, und wie apparativ an diese Probleme herangegangen werden kann.

2.2 Messung fester Schichten

2.2.1 Frühere Methode der Schichtherstellung

Zur IR Untersuchung sehr geeignet ist der amorphe feste Zustand einer Substanz, denn der Einfluß des Lösungsmittels entfällt, die Banden des untersuchten Systems treten klar hervor. Den biologischen Verhältnissen kommt man durch die Einstellung eines definierten Hydratationsgrades näher. Dies gelingt am besten mit dünnen Schichten des reinen Stoffes. Suspensionen oder KBr Technik sind für solche Untersuchungen nicht geeignet. Zur IR Untersuchung kann man Schichten herstellen, indem man eine wäßrige Lösung der Substanz bei geeignetem definiertem Dampfdruck auf einem Germaniumträger [+]) eindampfen läßt. Mühlinghaus (11) und Lubos (12) bedienten sich dieser Methode. Die von

---

[+]) Germanium ist zur Messung wäßriger Lösungen gut geeignet und ist im Bereich 4000 - 600 cm^{-1} nahezu ideal durchlässig. Vgl. 2.2.3.3

ihnen untersuchten Substanzen bildeten wegen ihres makromolekularen Aufbaus hinreichend gleichmäßige Schichten.

2.2.2 Versagen der früheren Methode

Das ADP-ATP System konnte mit dieser Methode nicht zu für quantitative Messungen geeigneten IR Proben verarbeitet werden. Dies lag zunächst daran, daß einerseits die Phosphatgruppen im Bereich 1300 - 1000 cm^{-1} sehr stark absorbieren, weswegen für die Aufnahme des Bereichs von 4000 - 600 cm^{-1} kleine Schichtdicken von ca. 10 μ zu wählen waren. Das bedingt andererseits jedoch nur kleine Effekte im Bereich um 2000 cm^{-1}, in dem die Kontinuumsabsorption gut zu beobachten ist. Auch absolut erwies sich der Kontinuumseffekt bei den amorphen festen Schichten als recht schwach.

Daher waren wir gezwungen, eine reproduzierbare Genauigkeit von $\pm 0{,}005$ in der Extinktion anzustreben. Leider erwiesen sich gerade ADP-ATP Lösungen als ungeeignet für die Schichtherstellung mit der normalen Methode. Der Träger war meist nicht vollständig zu benetzen, und selbst wenn dies gelang, konnte die Schichtdicke nicht mit der erforderlichen Genauigkeit reproduziert werden. Dies ist auf den starken Einfluß des Probenträgerrandes zurückzuführen. Dieser Einfluß konnte nicht unter Kontrolle gebracht werden. Weiterhin ist von Bedeutung, daß die Kohäsion der ursprünglich vorhandenen wäßrigen Lösungen mit der Protonierung variieren kann.

2.2.3 Apparat zur Herstellung reproduzierbarer Schichten

Wir gingen davon aus, daß eine Vervielfachung der Schwerkraftwirkung durch eine auf die eintrocknende Lösung in Richtung der Oberflächennormalen wirkende Zentrifugalkraft den Einfluß des Randes und der Kohäsion zum Verschwinden bringen würde.

2.2.3.1 Konstruktiver Aufbau

Abb. 1 zeigt einen Querschnitt durch das dafür konstruierte Gefäß, in dem nun der Film hergestellt wird. Es hat die Größe eines handelsüblichen Zentrifugenbechers und kann anstelle dessen in den Rotor einer Zentrifuge gehängt werden (z. B. Hettich, AHT 5000). Die Zentrifuge muß mit Swing-out-Rotor ausgerüstet sein, bei dem die vorher senkrecht hängenden Becher mit anwachsender Rotation in die Waagrechte ausschwingen. Die stationäre Rotationsgeschwindigkeit soll ca. 3000 U/min betragen, was ca. 2000 facher Erdbeschleunigung am Ort der Probe entspricht. Der Aufbau der Trockeneinrichtung geht ebenfalls aus Abb. 1 hervor. Nach Entfernung der Ueberwurfmutter kann die Trockeneinheit als Ganzes herausgenommen werden. Der Träger mit der Probenlösung befindet sich auf deren Boden, weil dort die Zentrifugalkraft am größten ist. In der ersten Etage ist die Salzlösung untergebracht, die gemäß der gewünschten Hydratation den Dampfdruck im Gefäß einstellt (alle hydratisierten Schichten in Abschnitt 3 wurden in einer NaOH Atmosphäre hergestellt- dies entspricht 7% Luftfeuchtigkeit).

Um den Austausch zwischen Salz- und Probenlösung zu beschleunigen, wird im Gefäß auf ca. 15 Torr evakuiert. Wenn während des Evakuierens ein Siedeverzug in der Salzlösung auftritt, verhindert das Blendensystem, daß ein Spritzer in die Probenflüssigkeit gelangen kann.

2.2.3.2 Justierung des Probenträgers

Die Schichtdicke beträgt bei meinen Untersuchungen 10 - 15 μ, die Ausdehnung der Schichten ist 12 x 24 mm. Die Schichtdickenschwankung beim Verkippen der Schichtnormalen $\vec{n}$ aus der Zentrifugalkraftrichtung $\vec{z}$ muß so gering bleiben, daß der ganze Probenträger bedeckt ist. Wie in Abschnitt 2.4.3 näher begründet wird, darf darüber hinaus das Verhältnis der größten zur kleinsten

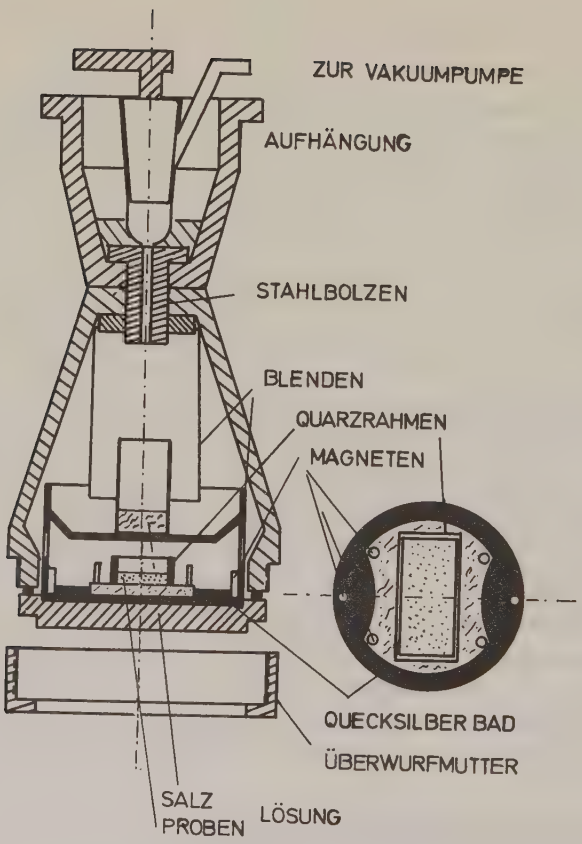


Abb. 1: Apparat zur Herstellung reproduzierbarer Schichten

Schichtdicke nicht größer als 2,5 werden. Dies ist in Abb. 2 dargestellt.

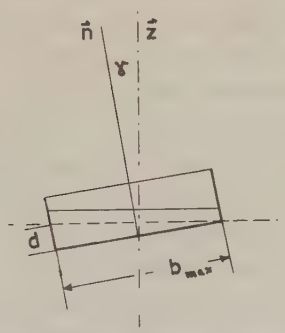


Abb. 2: Justierung des Probenträgers

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß für den maximal zulässigen Winkel zwischen $\vec{z}$ und $\vec{n}$ gilt:

$$\arc \gamma = \frac{d}{b_{max}} = \frac{10 \cdot 10^3}{24} \approx 4 \cdot 10^{-4}$$

Das ist die Mindestgenauigkeit für die Justierung des Schichtträgers zur z Achse. Sie läßt sich bei den hohen Kräften, die während der Zentrifugierung auftreten, mit einer starren Lagerung nicht erzielen.

Wir unternahmen deshalb zunächst den Versuch, durch eine langsame Eigendrehung des Gefäßes um die z Achse die notwendig auftretende Dejustierung ständig auszugleichen. Das Trockengefäß wurde zu diesem Zweck in einem Kugellager aufgehängt und durch einen Motor mit Getriebe gedreht. Auch sehr großer technischer Aufwand führte auf diesem Weg zu keiner zuverlässig arbeitenden Apparatur.

Das Problem wurde dann dadurch gelöst, daß wir den Probenträger während der Trocknung und Zentrifugierung auf einem Quecksilberbad schwimmen ließen (Abb. 1). So justiert sich der Träger automatisch relativ zu der resultierenden Kraft. Dabei muß allerdings durch einige Versuche mit schnell trocknenden Lösungen und Ausgleichsgewichten, die der ersichtlichen Dejustierung entsprechend angebracht sind, die Justierung optimiert werden. Damit entstehen so gleichmäßig dicke Schichten, daß die obige Genauigkeitsforderung erfüllt ist.

2.2.3.3 Zylinderschliff und stabile Lage des Trägers

Auf die Probenträger sind Quarzrahmen aufgekittet. Sie begrenzen die Fläche, auf der die Probenlösung eintrocknet. Diese Fläche ist so geschliffen und justiert, daß die Achse des Schliffs während der Trocknung mit der Zentrifugenachse übereinstimmt (vgl. Abb. 3).

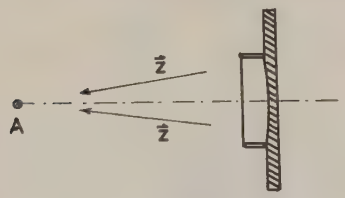


Abb. 3: Zylinderschliff

Dies entspricht der physikalischen Tatsache, daß an jedem Punkt der Flüssigkeitsoberfläche deren Normale die Richtung der resultierenden Kraft hat.

Kleine Magneten, die am Rand des Quecksilberbades und auf dem Träger gemäß Abb. 1 angebracht sind, halten durch ihre Abstoßung die Träger vom Rand fern und verhindern eine Drehung um die Achse $\vec{z}$.

Die Träger bestehen aus p dotiertem Germanium (spezifische Leitfähigkeit 50 Ω cm). Die beschriebene Einschleifung wurde zuerst maschinell grob vorgearbeitet. Eine streuungsfreie Oberfläche erzielten wir dann durch manuelles Einschleifen mit Diamantpasten der Korngrößen 30 µ, 7 µ, 1 µ und 0,25 µ [+]).

Die Trägerfläche, auf der die Lösung trocknet, wird vor dem Aufbringen der Lösung jedesmal leicht anoxydiert, z. B. mit H_2O_2 (30%ig). Die Benetzbarkeit des Germaniums wird dadurch sehr verbessert.

2.2.3.4 Handhabung und Genauigkeit

Die Trocknungszeit beträgt bei 20°C ca. 12 Stunden, bei 5°C ca. 4 Tage. Die Zentrifuge kann dabei mit einer eingebauten Kühlung thermostatisiert werden. Wir wählten eine Trocknungstemperatur von 20°C. Bis zu 6 Schichten können zusammen hergestellt werden.

[+]) Firma Winter Diaplast, Hamburg

Die Konzentration der zur Trocknung eingegebenen Lösung wurde UV photometrisch über die Absorption bei 260 nm ermittelt (vgl. Abschnitt 2.7.2.1). Da sich die UV Absorption von Adenosinphosphaten über unserem pH Bereich hinweg um weniger als 2% ändert (13), war die UV Bestimmung der eingegebenen Substanzmengen zusammen mit der automatischen Pipettierung [+]) genauer als eine Wägung. Nach Ermittlung der genauen Konzentration der Lösung wurde immer soviel in den Probenträger gefüllt, daß sich bei jeder Messung gleichviel Moleküle ADP bzw. ATP im Strahlengang befanden.

Die Messung der Schichten erfolgte in den normalen Küvetten, wie sie z. B. von Lubos (12) verwendet worden sind.

2.3 Messung von Lösungen

Sessler (5) hatte konzentrierte wäßrige Lösungen von Aminen untersucht. Er hatte eine Konzentration von 4 bzw. 6 H_2O pro Probenmolekül. Das ADP bzw. ATP ist dafür nicht genügend löslich. Darüber hinaus ist die höchste im physiologischen Bereich auftretende ATP Konzentration mit etwa 0,3 Mol/l abgeschätzt worden (14). In Vesikeln werden noch höhere Konzentrationen gefunden (14a). Deshalb mußte die Konzentration unserer Probenlösungen auf 0,3 Mol/l erniedrigt werden. Das entspricht 170 H_2O/ATP (vgl. Abschnitt 2.6.4). In einigen speziellen Fällen arbeiteten wir mit 60 H_2O pro Probenmolekül (vgl. Abschnitt 3.2).

Andere Lösungsmittel als Wasser wären keinesfalls sinnvoll, da für uns die Wechselwirkung des ADP-ATP Systems mit der Wasserstruktur von ganz besonderem Interesse war. Ein Kompensationsverfahren, in dem sich im Vergleichsstrahl ebenfalls Lösungsmittel befindet und ein Differenzspektrum aufgenommen wird, konnte nicht angewandt werden, denn in

---

[+]) Pipetten der Firma Eppendorf, Hamburg

den Bereichen hoher H_2O Absorption kommt wegen der Einwirkung der Substanz auf das Wasser kein eigentliches Differenzspektrum zustande.

Wegen der hohen Eigenabsorption des Wassers waren kleine Schichtdicken erforderlich. Um den nach vorbereitenden Messungen zu erwartenden Gang der Kontinuumsabsorption mit der Protonierung noch auflösen zu können, mußte die Schichtdicke der untersuchten Lösung bei einem absoluten Wert von 10 - 15 /u eine reproduzierbare Genauigkeit von ± 0,05 /u haben.

2.3.1 Küvette mit mechanisch einstellbarer Schichtdicke

Für die Messungen im gelösten Zustand benutzte ich zunächst die Küvette mit verstellbarer Schichtdicke, die von Kampschulte-Scheuing und Sessler (4) (5) benutzt worden und in (15) näher beschrieben worden ist. Die Schichtdicke konnte bei dieser Küvette variiert und damit der Aenderung der Dichte mit der Protonierung angepaßt werden. Die für meine Messungen erforderliche Genauigkeit konnte ich mit ihr jedoch nicht erzielen.

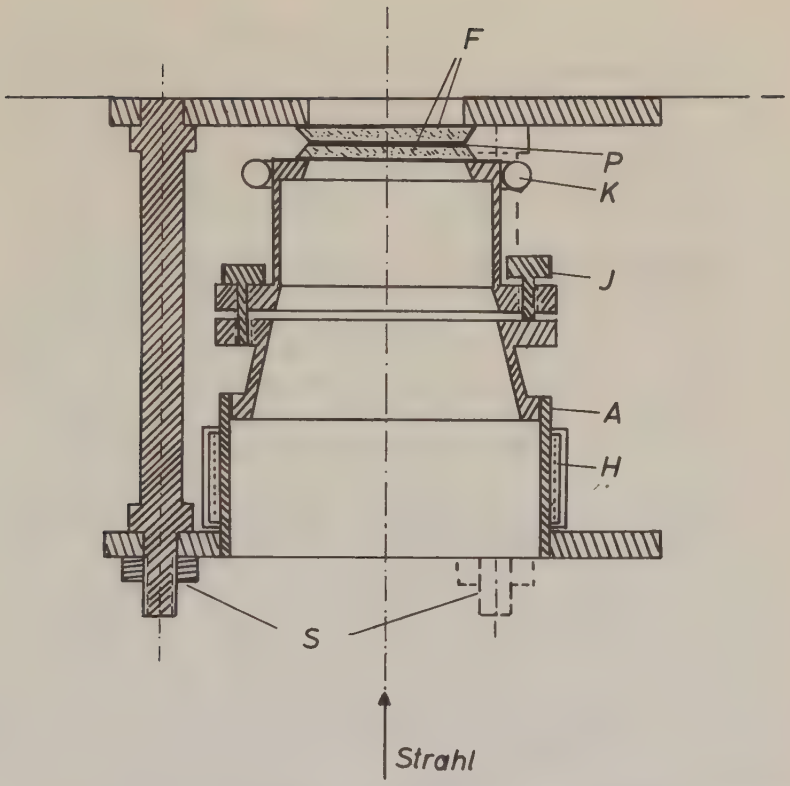
2.3.2 Küvette mit thermischer Justierung

Einen Weg, die Meßmöglichkeiten einer Küvette mit verstellbarer Schichtdicke zu verbessern, sah ich in einer thermischen Justierung der die Meßlösung begrenzenden Germaniumfenster. Eine entsprechende Küvette wurde gebaut, sie ist in Abb. 4 wiedergegeben. Innerhalb eines Skeletts aus Vacodil-Stahl +), der sich bei Erwärmung nicht ausdehnt, sorgt ein Ausdehnungskörper aus Messing, der elektrisch beheizt und thermostatisiert wird, für die Justierung.

Ein Problem war und blieb die Beschickung der Küvette. Wegen dieser Schwierigkeit und wegen der für die Praxis

---

+) Vacuumschmelze, Hanau



F: Germaniumfenster
P: Probe
K: Kühlung
A: Ausdehnungskörper aus Messing
H: Heizung
S: Skelett aus Vacodil-Stahl

Abb. 4: Küvette mit thermischer Justierung

zu komplizierten Handhabung benutzte ich diese Küvette für die Messungen in Abschnitt 3 nicht. Auf Grund ihrer erprobten, sehr hohen reproduzierbaren Genauigkeit ist sie aber für eine Meßreihe gut geeignet, bei der die Probe nicht gewechselt werden muß. Beispiel: Messung der Temperaturabhängigkeit einer Absorption.

2.3.3 Flüssigkeitsküvette mit konstanter Schicht

Wie erläutert, führt die Notwendigkeit relativ verdünnter Lösungen zu recht hohen Ansprüchen an die Genauigkeit der Schichtdicke. Dafür gewinnt man aber die Möglichkeit, bei konstanter Schichtdicke zu arbeiten, weil sich die Dichte verdünnter Lösungen mit der Protonierung nur vernachlässigbar ändert. Das führte dazu, einfache Küvetten zu erproben, die aus 2 Germaniumplatten und Abstandsgeber hergestellt waren.

Von dieser Möglichkeit wird viel Gebrauch gemacht, auch bei im Handel erhältlichen Küvetten. Für unsere Zwecke bewährte sich die Methode nicht, weil sich der Abstandsgeber (eine Platinfolie von 20 µ Stärke) bei der Reinigung zwischen den Messungen nicht entfernen läßt, ohne daß die Reproduzierbarkeit verloren geht. Mit fest eingelegtem Abstandsgeber ist die Reinigung wiederum sehr erschwert und unzuverlässig.

Für sehr dünne Schichten läßt sich mit aufgedampften Abstandsgebern arbeiten. Rissman (16) hat eine Küvette für Messungen bei 3 µ Schichtdicke beschrieben, die einen aufgedampften Abstandsgeber aus Silber enthält.

Wir schlugen einen anderen Weg ein, der uns den Vorteil zu bieten schien, daß sich Dicke und Form des eingeschlossenen Flüssigkeitsvolumens durch eine einfache Bearbeitung der Fenster verändern läßt.

2.3.3.1 Konstruktiver Aufbau

Abb. 5 zeigt die Flüssigkeitsküvette, wie sie für die Messungen in Abschnitt 3 verwendet wurde. Sie ist eine Weiterentwicklung einer anderen Ausführung, die mir in der Handhabung (es muß unter Stickstoffspülung gearbeitet werden, solange die Küvette offen ist) zu kompliziert erschien. Papakostidis (17) hat diese erste Ausführung für einige seiner Messungen verwendet. Sie ist dort beschrieben.

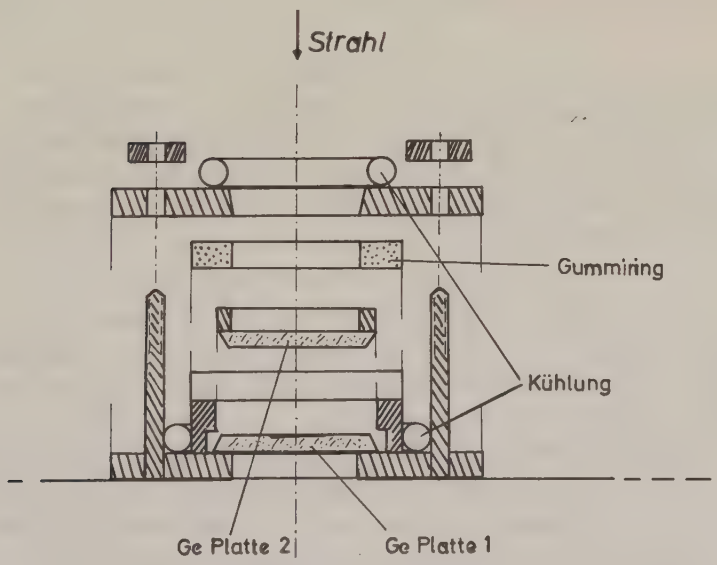


Abb. 5: Flüssigkeitsküvette mit konstanter Schichtdicke

Platte 1 ist mit einem Schliff mit keilförmigem Querschnitt versehen. In Abb. 5a ist dies schematisch dargestellt. Das Oberflächenprofil hat den Zweck, eine Dreipunktauflage zu gewährleisten.

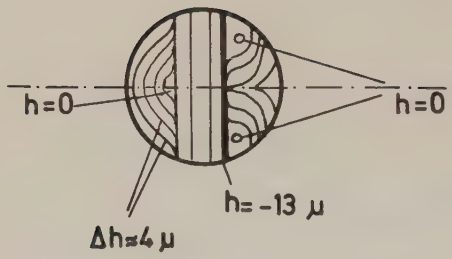


Abb. 5a: Höhenlinienbild von Ge-Platte 1

Der Gummiring mit Rechteckquerschnitt dient gleichzeitig als Dichtung und Druckübertrager. Durch ihn wird die Platte 2 durch Zudrehen der Schrauben gegen Platte 1 gepreßt. Die Druckkraft wird so groß gewählt, daß bei weiterer Druckerhöhung keine Veränderung der Küvetten-Nullinie mehr festzustellen ist.

Die mittlere Schichtdicke beträgt 13 µ. Die Thermostatisierung der Küvette geht aus der Abb. 5 hervor. Als Vergleichsküvette dienten 2 ebene Germaniumplatten, mit denen bei leerer Küvette der Nullabgleich für alle Wellenlängen optimiert wurde.

Wesentlich ist eine exakte seitliche Führung von Platte 2. Außerdem ist darauf zu achten, daß Platte 2 von einer Messung zur anderen gegenüber Platte 1 nicht verdreht eingesetzt wird. Ich konnte feststellen, daß sich die Nullinie der Küvette bei einer seitlichen Verschiebung der beiden Platten um 0,1 mm gegeneinander bereits deutlich ändert. Dies liegt daran, daß die Germaniumoberflächen nie besser als auf ca. 1 µ eben gemacht werden können. Daher kann eine seitliche Verschiebung eine Aenderung der Interferenzen des Probenstrahls mit sich bringen.

Der Schliff in Platte 1 wurde mit einer normalen Fräsmaschine hergestellt, in die statt eines Fräsers ein

exakt bearbeiteter Hartgummizylinder eingespannt wurde. Das Profil, das in Abb. 5a gezeigt ist, wurde von Hand hergestellt. Als Schleifmittel diente Diamantpaste mit Korngrößen von 3 - 0,25 /u.

2.3.3.2 Spezifische Fehlerquellen

Es gibt einige Fehler, die vornehmlich bei der Messung von Flüssigkeiten auftreten. Sie hängen wesentlich von der experimentellen Anordnung ab. Die folgenden Abschnitte behandeln deshalb 2 apparative Probleme, die bei der beschriebenen Flüssigkeitsküvette eine Rolle spielen.

Zum Unterschied dazu gibt es eine Reihe von theoretischen Ueberlegungen, die angestellt werden müssen, wenn man den Absorptionsindex, d. h. den Imaginärteil des Brechungsindex $\hat{n} = n+ik$ eines Stoffes möglichst fehlerfrei absolut bestimmen will. Absorption A und Absorptionsindex k sind durch folgende Beziehung verknüpft:

$$k = \frac{2{,}303 \cdot A}{\bar{\nu} \cdot 4\pi \cdot d}$$

Der Zähler ist dabei gleich der Extinktion, die nach 2.4.3.1 unter bestimmten Voraussetzungen eine Meßgröße ist, wenn nicht absorptions- und wellenlängenabhängige Reflexionsverluste wesentlich werden. Young und Jones haben die theoretischen Probleme der Absolutbestimmung der Absorption von Flüssigkeiten zusammenfassend behandelt (18).

Diese Effekte brauchen in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt zu werden, da wir es mit der Aufgabe zu tun haben, sehr genaue vergleichende Messungen anzustellen. Die beiden Probleme, die in dieser Arbeit speziell bei den Flüssigkeitsmessungen auftraten, waren Streuung und Interferenz auf Grund der Wirkung der begrenzenden Flächen.

a) Streuung

Eine Abnahme der Nullextinktion mit der Wellenlänge ist auf Streueffekte im Hauptstrahlengang zurückzuführen. In diesem Fall konnte eine wellenzahlunabhängige Nullinie durch systematische Bearbeitung der Oberflächen der Vergleichsküvette erzielt werden. Dieses einfache Verfahren vermindert zwar die zur Messung verfügbare Energie, doch ist es in manchen Fällen dem nachträglichen Glätten der Oberfläche in der Probenküvette vorzuziehen.

b) Interferenz

Die beschriebene Küvette bietet den Vorteil, daß mit einer einmal vollzogenen Eichung eine größere Anzahl Spektren aufgenommen werden kann. Die Nullinie verändert sich nicht, wenn die Punkte, die in dem Abschnitt 2.3.3.3 angegeben sind, beachtet werden.

Wir konnten jedoch kein Verfahren entwickeln, mit dem nach festgelegten Regeln eine einwandfreie Nullinie zu bekommen war. Dies liegt nicht daran, daß der beschriebene Keilschliff und die ebene Platte nicht exakt genug hergestellt werden können.

Allgemein läßt sich folgendes bemerken: Es treten wegen der Reflexion an den Germaniumoberflächen immer Interferenzen auf. Sie sind am ausgeprägtesten für 2 zueinander planparallele Platten. Wenn man die Wellenzahlen durchläuft, treten Maxima und Minima der Extinktion auf. Der Abstand zweier benachbarter Maxima ist gegeben durch

$$\bar{\nu}_{i+1} - \bar{\nu}_{i} = \frac{10^4}{2nd}$$

ν_i: Wellenzahl (cm^{-1})
n: IR-Brechungsindex
d: Schichtdicke (μ)

Durch eine geeignete Wahl der möglichen Gangunterschiede muß angestrebt werden, daß die interferierende Gesamtintensität für alle Wellenlängen gleich groß wird. Bei dem

beschriebenen Keilschliff liegt eine linear anwachsende Entfernung zwischen den reflektierenden Germaniumflächen vor, die interferierende Strahlen erzeugen. Das ist eine Näherung für die genannte Forderung.

Es ist anzunehmen, daß ein Schliff, der die komplizierte Symmetrie des Strahlengangs berücksichtigt, zu befriedigenderen Ergebnissen führt. Dessen Herstellung ist jedoch mit größten technischen Schwierigkeiten verbunden.

Die von uns gestellte Anforderung an die Nullinie war:

Schwankung Δ Extinktion $\leq$ 0,015 für Wellenzahlen $\geq$ 1000 cm^{-1}
Δ Extinktion $\leq$ 0,03 für Wellenzahlen $\leq$ 1000 cm^{-1}

2.3.3.3 Experimentelle Praxis

Die Küvette läßt sich schnell und unkompliziert beschicken, auch in der Glovebox oder unter Stickstoffspülung. Eine intensive Reinigung ist leicht möglich.

Die Germaniumoberflächen dürfen zwischen den Messungen nicht mit Schleifpaste oder Chrom-Schwefel-Säure behandelt werden. Dies verändert die Schichtdicke über das zulässige Maß hinaus. Wir wuschen die Küvette zwischen den Messungen mit konzentrierter Prillösung, dann mit Wasser und zuletzt sehr sorgfältig mit H_2O bidest.

Die in 3 behandelten Messungen wurden bei 5°C durchgeführte. Dies ist die im Flüssigkeitsthermostaten eingestellte Temperatur. Die Temperatur in der Küvette selbst wurde nicht gemessen, war aber konstant während eines Spektrums und von einer Messung zur anderen, da auch der Probenraum des Spektrometers thermostatisiert ist.

Reinigungsmittel wie z. B. Aceton, Benzol etc. sind nicht geeignet. Die Plattenoberflächen dürfen nach der Reinigung nicht berührt werden. Man kann sie jedoch mit Heißluft trocknen.

2.4 Allgemeine Fehlerquellen

Neben den bei der Flüssigkeitsküvette wegen ihrer zwei Germaniumfenster speziell auftretenden Fehlerquellen gibt es auch noch einige allgemeinere Fehler.

2.4.1 Unterschiedliche Nullextinktion in den beiden Strahlengängen

Eine Unsymmetrie in den Absorptionen der beiden Strahlengänge, bei leerer Probenküvette, kann zunächst die einfache Ursache haben, daß die Fenstermaterialien nicht genau genug zusammenpassen. Dieser Fehler stellt sich bei der Aufnahme der Nullinie heraus und ist relativ leicht zu beseitigen.

Jedoch ist auch zu beachten, daß in keinem der beiden Strahlengänge der wirksame Strahlquerschnitt, z. B. durch die Fensterfassungen, beschnitten werden darf. Neben den bekannten Sprüngen an den Umschaltstellen des Spektrometers wird dadurch vor allem der Nullwert der Durchlässigkeit von der genauen Lage der beiden Küvetten abhängig. Diese Fehler sind sehr schwer erkennbar.

2.4.2 Erwärmung der Vergleichsküvette

Ich beobachtete, daß die Aenderung der Eigenstrahlung der Fenster in der Vergleichsküvette und insbesondere des Vergleichsstrahl-Abschwächers Fehler in der Extinktion von 0,02 verursachen kann. Diese Aenderung entsteht z. B., wenn der Abschwächer kurz vor oder während einer Messung eingesetzt wird und sich dann erst auf die Temperatur von 40°C erwärmt, bei der der Spektrograph thermostatisiert ist. Vergleichsküvette und Abschwächer sind also bereits 5 Minuten vor der Messung im Probenraum des Spektrometers anzuwärmen.

2.4.3 Schwankung der Schichtdicke über den Strahlquerschnitt

2.4.3.1 Die Extinktion als abgeleitete Größe

Das Ziel der quantitativen Spektroskopie ist es, die Absorption verschiedener Substanzen für die jeweilige Wellenlänge miteinander möglichst genau zu vergleichen. Meßgröße ist die Durchlässigkeit des Mediums. Sie ist definiert durch:

$$D = \frac{J}{J_0} \qquad (1)$$

Wie hängt nun D mit der absorbierenden Eigenschaft der Probe, d. h. mit k, dem Imaginärteil des Brechungsindex zusammen? Wie in 2.3.3.2 erläutert, ist diese Frage bei uns gleichbedeutend mit der Frage nach der Extinktion.

Betrachten wir den Fall, daß die Schichtdicke der Probe über den Strahlquerschnitt hinweg konstant ist. Bei allen unseren Messungen kann dann die Gültigkeit des Lambert'schen Gesetzes angenommen werden:

$$D = J/J_0 = e^{-\alpha d} \qquad (2)$$

Wegen der Beziehung $k = \frac{\alpha d}{4\pi\bar{\nu}.d}$ kann man in diesem Fall aus der Messung von D sofort k erhalten. Für die Extinktion E gilt $E = \frac{\alpha d}{2,303}$, weil E üblicherweise als der Logarithmus vom D zur Basis 10 definiert wird. Bei konstantem d ist also die Extinktion ein direktes Maß für die absorbierende Eigenschaft des untersuchten Stoffes. Man muß aber im Auge behalten, daß sie eine abgeleitete Größe ist. Im Fall von über den Schichtquerschnitt hinweg wechselnder Schichtdicke existiert keine Beziehung der Form (2) mehr.

Es zeigt sich hier ein Problem, das speziell für IR Messungen von Bedeutung ist, weil hier wegen der notwendigen sehr kleinen Schichtdicken die Abweichung der Schichtbegrenzungsflächen von der Planparallelität zur Wirkung kommt. Im folgenden möchte ich das Problem allgemein und in einigen praktisch wichtigen Fällen betrachten.

2.4.3.2 Allgemeiner Fall

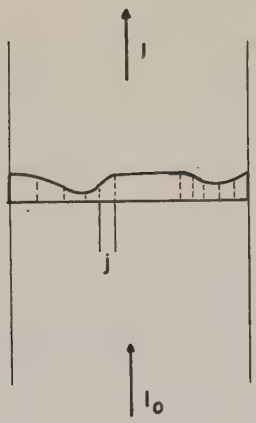


Abb. 6: Schema einer Probenschicht

In Abb. 6 ist eine Probe mit wechselnder Schichtdicke im Querschnitt schematisch dargestellt. Die gesamte absorbierende Querschnittfläche ist in n Bereiche aufgeteilt. Diese sind so gewählt, daß in jedem dieser Bereiche die Schichtdicke so konstant ist, daß das Lambert'sche Gesetz (2) hinreichend genau gilt. D. h. z. B. im Bereich mit der Nummer j

$$I_j = I_{oj}\, e^{-\alpha d_j}$$

Dann gilt für die gesamte Schicht, bei über den Strahlquerschnitt hinweg konstanter Intensität I_o:

$$I = I_o \cdot \sum_{j=1}^{n} f_j e^{-\alpha d_j} \qquad (3)$$

Dabei ist f_j der Bruchteil der auf 1 normierten Gesamtfläche, der zu dem Bereich mit der Nummer j gehört.
Die Durchlässigkeit ist:

$$D = \frac{I}{I_o} = \sum_{j=1}^{n} f_j e^{-\alpha d_j} \qquad (4)$$

2.4.3.3 Von ebenen Flächen begrenzte Schicht

Behandeln wir nun speziell den Fall der von zwei ebenen Flächen begrenzten Schicht, der in der beschriebenen Küvette (Abschnitt 2.3.3) angenähert verwirklicht ist. Im Anschluß an Abb. 6 wollen wir zunächst eine

Schicht betrachten, deren gesamter vom Strahl erfaßter Querschnitt eine Treppe bildet. Folgendes läßt sich aus (3) ableiten:

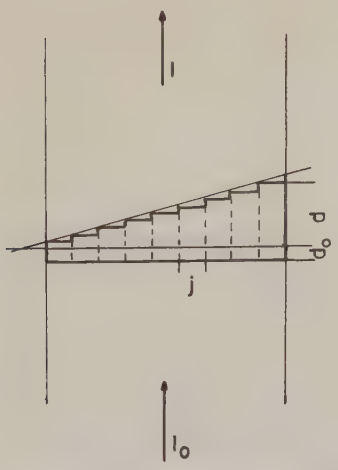


Abb. 7: Schicht mit treppenartigem Querschnitt

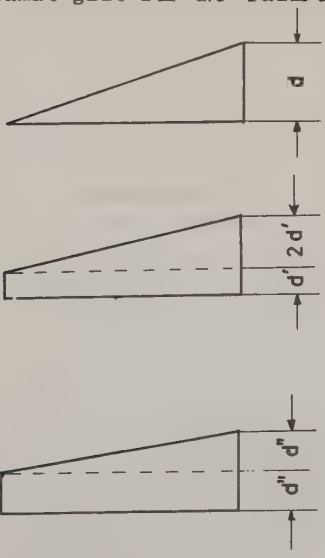
$$I = I_o \frac{1}{n} \sum_{j=1}^{n} e^{-\alpha \cdot (\frac{jd}{n} + d_o)} \quad (5)$$

Für $n \longrightarrow$ und $\frac{jd}{n} \longrightarrow x$ ergibt sich

$$I = I_o \quad \frac{1}{d} \int_{o}^{d} e^{-\alpha x} \, dx \cdot e^{-\alpha d_o}$$

$$I = I_o \frac{1}{d} \int_{d_o}^{d+d_o} e^{-\alpha x} \, dx \quad (6)$$

Damit gilt für die Fälle der Abb. 8:



$$D_a = \frac{1}{d\alpha} (1 - e^{-\alpha d}) \quad \underline{\text{Fall a}} \quad (7)$$

$$D_b = \frac{1}{2d'} \int_{d'}^{3d'} e^{-\alpha x} \, dx \quad \underline{\text{Fall b}}$$

$$= \frac{1}{2d'\alpha} (e^{-\alpha d'} - e^{-3\alpha d'}) \quad (8)$$

$$D_c = \frac{1}{d''} \int_{d''}^{2d''} e^{-\alpha x} \, dx \quad \underline{\text{Fall c}}$$

$$= \frac{1}{\alpha d''} (e^{-\alpha d''} - e^{-2\alpha d''}) \quad (9)$$

Abb.8: Schichten mit verschiedenen Querschnitten

Betrachten wir nun, was sich im Gegensatz zu den Ergebnissen (7) - (9) ergibt, wenn man die wirksame Schichtdicke durch arithmetische Mittelwertbildung aus allen vorkommenden Schichtdicken ermittelt. Zunächst sieht man aus Abb. 8a, b, c, daß für die so linear ermittelte Schichtdicke gilt:

Fall a $\quad \bar{d}_a = d/2 \qquad (10)$

Fall b $\quad \bar{d}_b = 2d' \qquad (11)$

Fall c $\quad \bar{d}_c = 3/2\ d'' \qquad (12)$

Es wird nun eine entsprechende Durchlässigkeit definiert:

$$\bar{D}_{a,b,c} := e^{-\alpha \bar{d}_{a,b,c}} \qquad (13)$$

Der Zusammenhang zwischen den beiden Größen D und $\bar{D}$ ist durch die Beziehungen (7) - (13) für die Fälle a, b und c gegeben. Für den Fall a ist das Ergebnis der Berechnung in folgender Tabelle wiedergegeben:

$D = \frac{1}{\alpha d}(1-e^{-\alpha d})$	$\alpha \bar{d} = \frac{\alpha d}{2}$	$\bar{D}$	$-\ln D$
0,949	0,053	0,949	0,053
0,896	0,111	0,890	0,110
0,841	0,178	0,837	0,174
0,783	0,255	0,775	0,245
0,720	0,347	0,706	0,329
0,655	0,458	0,632	0,423
0,580	0,600	0,548	0,545
⋮	⋮	⋮	⋮

Tabelle 1: Abweichungen auf Grund der nichtkonstanten Schichtdicke

Man erkennt, daß mit abnehmender Durchlässigkeit die beobachtete Durchlässigkeit immer mehr die der vergleichbaren planparallelen Schicht übersteigt. In der Tabelle sind auch die Werte der Größen $-\ln D$ und $\alpha \bar{d}$ angegeben. Aus ihnen kann eine Korrektur der beobachteten Extinktion abgeleitet werden.

Die Meßgröße ist D, damit ist die beobachtete Extinktion

$$E_{obs} = - \ln D \qquad (14)$$

Die korrigierte Extinktion ist

$$E_{korr} = - \ln \bar{D} = \alpha\bar{d} \qquad (15)$$

Beide Größen lassen sich in Abhängigkeit von der Variablen αd berechnen. Somit läßt sich E_{korr} als Funktion von E_{obs} graphisch darstellen. Dies ist in Abb. 9 geschehen. Die Wahl von E_{korr} nach Gleichung (15) ist sinnvoll, weil für kleine Extinktionen $E_{obs} = E_{korr}$ ist. Die Kurven sind zur Ermittlung des zu erwartenden Fehlers zu gebrauchen.

Die Bedeutung dieses Zusammenhanges für das Experiment zeigt der nächste Abschnitt. Für die Eichung, die auch diesen Fehler korrigiert, sind spezielle Eichkurven anzufertigen (siehe Abschn. 2.4.3.5).

2.4.3.4 Der Fehler bei der Eichung der Schichtdicke

Wie man aus den Beziehungen (7, 8 und 9) erkennt, hängt die Durchlässigkeit für alle von ebenen Flächen begrenzten Schichten nur vom Produkt αd ab. Wenn das Verhältnis Keil:Rechteck im Querschnitt der Probe konstant bleibt, beeinflußt es also den Fehler nicht, ob man ein stark absorbierendes Medium mit dünner Schicht mißt oder umgekehrt. Jedoch ersieht man aus Abb. 9, daß dieses Verhältnis im Querschnitt der Probe entscheidend ist. Das führt uns zum Problem der Eichung bei Küvetten mit verstellbarer Schichtdicke.

Die Schichtdicken-Eichung wird gewöhnlich mit einem Stoff bekannter Absorption durchgeführt. Damit ist die Extinktion und die Durchlässigkeit einer mittleren Schichtdicke zugeordnet. Für die Zuordnung der Extinktion benutzt man die Skala des Registrierpapiers gemäß Formel (2).

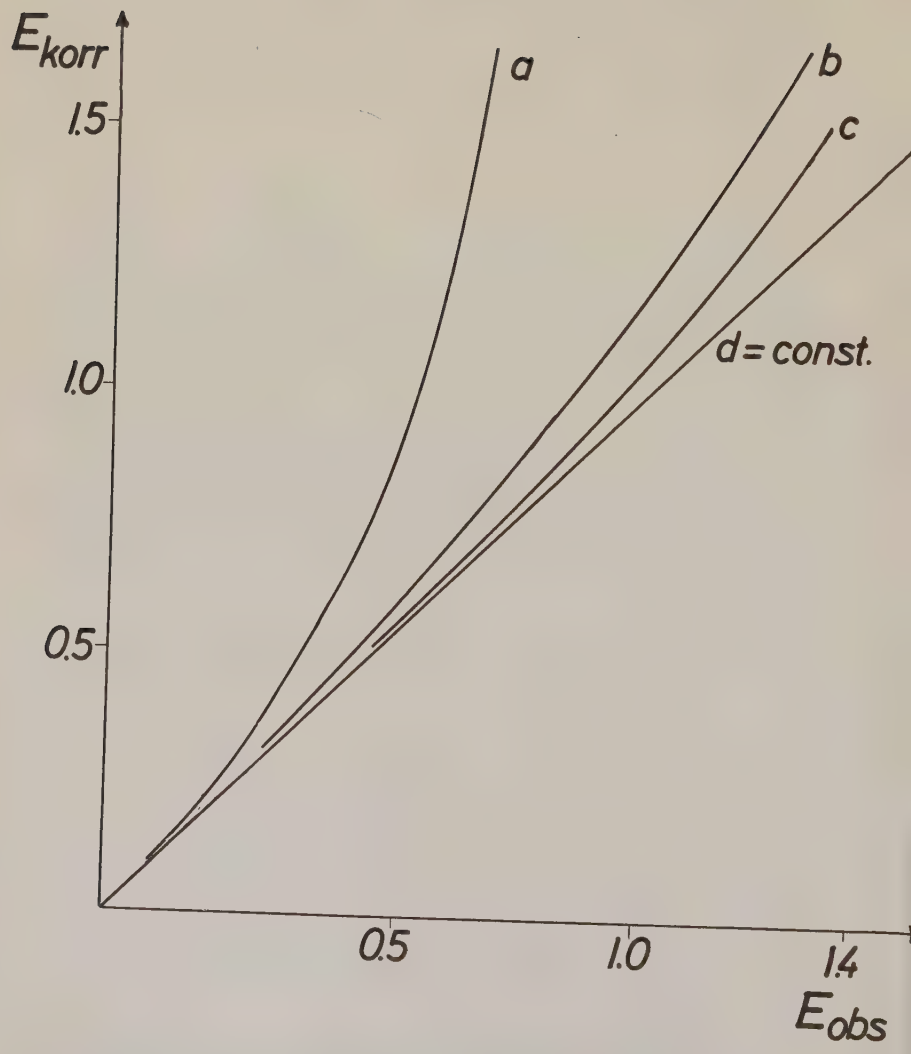


Abb. 9: Die Abhängigkeit der korrigierten Extinktion E_{korr} von der beobachteten Extinktion E_{obs} für die Fälle a, b und c, sowie für d = const.

Eine eventuelle Schwankung der Probenschichtdicke über den Strahlquerschnitt hinweg wird bei diesem Verfahren zwar ausgemittelt, jede solche Mittelung gilt jedoch nur für Proben mit $\alpha \approx \alpha$ (Eichsubstanz). Dazu ein Beispiel: Wird mit den Banden des Benzols bei 1959 cm^{-1} und 1815 cm^{-1} geeicht, so entspricht einer Durchlässigkeit von D = 20% eine Schichtdicke von $d \approx 70$ /u. Eine Schwankung der Schichtdicke über die Schicht hinweg von d = 10 /u ist bedeutungslos und geht infolgedessen in die Eichung nicht ein. Wenn nun ein stark absorbierendes Medium, z. B. K_3PO_4 im Bereich der Phosphatbanden, gemessen wird, so entspricht einer Durchlässigkeit von D = 20% eine Schichtdicke von $d \approx 15$ /u. Eine Schwankung von 10 /u fällt hier bereits stark ins Gewicht.

2.4.3.5 Der zu erwartende Fehler in praktischen Fällen

1. Zwei planparallele Platten

Abb. 10 zeigt die Verhältnisse bei zwei planparallelen Platten, die gegeneinander verkippt sind.

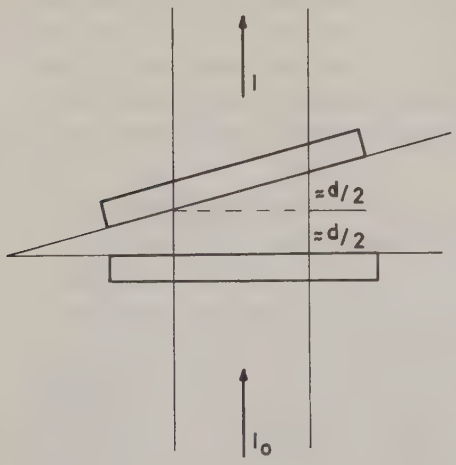


Abb. 10: Zwei planparallele Platten

Hier ist die Breite des Strahlenganges etwa halb so groß wie der Plattendurchmesser. Das Keil:Rechteckverhältnis bleibt beim Verkippen stets konstant. Es entspricht mit guter Näherung dem Fall b, wenn die Platten einander an einem Punkt berühren. Der Fall c, der in der Abb. 10 dargestellt ist, dürfte der in der Praxis häufigste Fall sein. Damit haben die zugehörigen Messungen im Extinktionsbereich

$E \approx 1{,}0$

eine Verzerrung von 4-6%.

2. Keilschliff

Der ungünstigste Fall kann selbst bei einem Keilschliff kaum vorkommen, da der Strahlquerschnitt immer etwas schmaler ist als der Schliff.

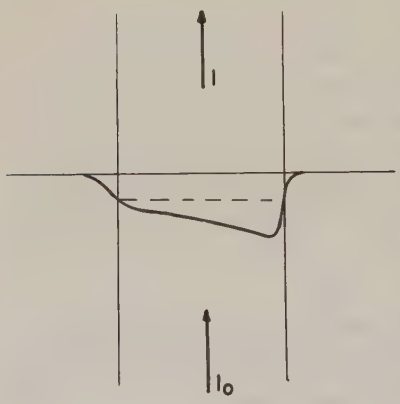


Abb. 11: Schema des Keilquerschnitts in der Küvette in Abschnitt 2.3.3

Für die in Abschnitt 3 wiedergegebenen Messungen an Lösungen mit der in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Flüssigkeitsküvette lag ein Querschnitt vor, wie er in Abb. 11 dargestellt ist. Er entspricht annähernd Fall b. Bei der Ausmessung der Kontinuumsabsorption spielt der Verzerrungseffekt keine Rolle, wenn gilt E = 0,15. Diese Bedingung ist bei allen Messungen in Abschnitt 3 erfüllt. Für eine bezüglich der Extinktion quantitative Auswertung der Banden im Bereich der PO Schwingungen und insbesondere der H_2O Torsionsschwingungen wären dagegen Korrekturen von bis zu 20% anzubringen.

Dazu ist eine Eichung der zur Messung verwendeten Schicht vorzunehmen, die der berechneten Eichung in Abb. 9 entspricht. Man kann dazu eine Lösung verwenden, in der die Konzentration des gelösten Stoffes (der bei der gewählten Wellenlänge stark absorbiert) schrittweise erhöht wird. Es muß gesichert sein, daß die Absorption proportional der Konzentration des gelösten Stoffes ist (Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes) [+].

[+]) Schiöberg (18a) hat mit einem Keil der in Abb. 11 dargestellten Art, aber größerem Keil.Rechteckverhältnis diese Eichung durchgeführt und Kurven wie in Abb. 9 erhalten.

2.5 Spektrometer

Die Spektren wurden mit einem IR Gitterspektrometer der Firma Perkin-Elmer, Modell 325, aufgenommen. Probenraum und Innenraum wurden während der Messung mit getrockneter und CO_2 freier Luft durchgespült. Die Wellenzahleichung wurde anhand der Banden des H_2O und CO_2 der Luft und mit Polystyrol-Banden kontrolliert (siehe Anleitung zum Gerät PE 325). Gemessen wurde der Bereich 4000 - 600 cm^{-1}. Die meisten Spektren wurden mit 2-facher Dehnung aufgenommen. Es wurde Spaltprogramm 6,5 gewählt, die Verstärkung betrug 3,0, die Zeitkonstante war 3. Die Registriergeschwindigkeit wurde individuell verändert, betrug jedoch nie mehr als Stufe 4, mit Vorgelegegetriebe. Die Empfindlichkeit wurde gelegentlich überprüft.

2.6 Die Substanzen und ihre Herstellung

Fast alle Ausgangssubstanzen konnten käuflich erworben werden. Unter Ausgangssubstanzen seien die Salze des ATP^{4-}, ADP^{3-} und PO_4^{3-} verstanden, durch deren Mischung die zur Messung verwendeten Stoffe erhalten wurden. Die letzteren wurden immer als wässrige Lösung und möglichst direkt in der gewünschten Konzentration hergestellt, um bei den zum Teil empfindlichen Lösungen ein nachträgliches Konzentrieren zu vermeiden.

2.6.1 Käufliche Ausgangssubstanzen

Alle Substanzen wurden in kristallisierter Form bezogen.

Substanz	Bezugsfirma
Mg_2 ATP	K + K Laboratories Plainview N.Y. USA (über Serva, Heidelberg)
K_2H_2 ATP	Sigma Chem.Comp., St.Louis USA
H_4 ATP	Fluka AG, Buchs (Schweiz)
Na_4 ATP	Schuchardt, München

H_3 ADP	Boehringer, Mannheim
Na_3 ADP	Merck AG, Darmstadt
K_3PO_4	
$K_2H\ PO_4$	Merck AG, Darmstadt
KH_2PO_4	
H_3PO_4	

Tabelle 2: Käufliche Ausgangssubstanzen

2.6.2 Herstellung der nicht käuflichen Ausgangssubstanzen

2.6.2.1 Herstellung im Ionenaustauscher

Mg_3 ADP_2 wurde mit Mg^{2+} beladenem Ionenaustauscher hergestellt. Dafür wurde eine 30 cm lange Säule (Querschnitt 1 cm^2) mit stark saurem Ionenaustauscher I, Art. Nr. 4765 der Firma Merck, gefüllt und in die offene Kühltruhe gestellt. So ging der Austausch bei ca. 5°C vor sich. Nach intensiver Spülung mit H_2O bidest wurde bis zur neutralen Reaktion der austretenden Lösung konzentrierte $MgCl_2$ Lösung durch die Säule geleitet. Dann wurde wieder mit H_2O bidest gespült, bis mit Silbernitrat keine Cl^- Ionen mehr nachgewiesen werden konnten. Dann wurden 500 µl einer 0,5 M ADP Lösung (hergestellt mit dem sehr reinen H_3 ADP von Boehringer und H_2O bidest) durch die Säule geschickt. Dies dauerte etwa 10 Minuten. Nachgespült wurde mit 5 ml H_2O bidest in kleinen Portionen (60 Minuten). Die gesamte erhaltene Lösung wurde 24 Stunden gegen flüssigen Stickstoff eingetrocknet.

Der anschließende Enzym-Test ergab 5% AMP.

Die Kohlenstoff-Elementaranalyse ergab 23,9%C. Der theoretische Prozentanteil für reines Mg_3 ADP_2 ist

$$\frac{10 \cdot M_C}{M} = \frac{120,1}{460,7} = 26,1\%$$

Nach Formel (2) im Abschnitt 2.7.1 ergibt sich für n_w, die Anzahl der Wassermoleküle, die pro ADP Molekül in der gewonnenen Substanz enthalten sind, folgende

Beziehung:

$$\frac{120,1}{461 + 18 \cdot n_w} = 0,26$$

Daraus berechnet sich $n_w = 2,15$.

Verunreinigungen der getrockneten gewonnenen Substanz verraten sich durch eine deutliche Gelbfärbung. Deswegen empfiehlt es sich, bis zur Trockne einzudampfen.

Die Färbung kann vom Farbstoff stammen, der neuen Ionenaustauschern zugesetzt ist. Sie tritt auf, wenn dieser nicht sorgfältig genug gewaschen wurde. Auch Unterschiede im Ergebnis der N Analyse gegenüber der C Analyse lassen sich dazu verwenden, Verunreinigungen zu erkennen. Diese enthalten ja meist weit mehr C als N. Die Genauigkeit der N Analyse ist freilich wegen des geringen N Anteils von ca. 15% schlechter.

Nach der Formel(1)im Abschnitt 2.7.1 wurde dann aus dem so hergestellten Mg_3 ADP_2 eine 0,3 M Lösung unter Berücksichtigung des bereits vorhandenen Wassers hergestellt.

Dies geschah unter Stickstoffspülung. Der Stickstoff wurde vorher durch Natronasbest und Wasser geleitet, um ihn CO_2 frei zu machen und um für die nötige Feuchtigkeit zu sorgen. An dieser Stelle möchte ich darauf hinweisen, daß auch alle anderen Arbeiten mit den zur Messung verwendeten Lösungen in CO_2 freier Atmosphäre durchgeführt werden müssen.

2.6.2.2 Neutralisation

ATP Salze konnten im Ionenaustauscher nicht hergestellt werden, da das ATP während der Prozedur zu stark hydrolysierte. K_4 ATP und auch K_3 ADP konnten durch Neutralisation hergestellt werden. Dieses Verfahren ist wesentlich schonender als die Herstellung im Ionenaustauscher. Bei Anwendung dieses Verfahrens wurde beim ADP^{3-} kein Zerfall durch Hydrolyse festgestellt. Beim ATP^{4-} wurden ca. 15% Hydrolyse gemessen.

Als Beispiel sei die Herstellung einer 0,3 M Lösung von K_3 ADP beschrieben:

Einwaage: a mg H_3 ADP MG : 430

a mg = $\frac{a}{430}$ m Mol H_3 ADP

Zur Neutralisation sind nötig: $3 \cdot \frac{a}{430}$ m Mol KOH

oder ebensoviel ml einer 1 M Lösung

1 M KOH Lösung enthält 56.1 mg KOH/ml Lösung

also 1 ml Lösung $\hat{=}$ 944 /ul H_2O

$b = 3 \cdot \frac{a}{430}$ 944 /ul

Dies ist die bereits von der KOH Lösung her vorhandene H_2O Menge.

170 H_2O/ADP $\hat{=}$ 0,3 M Lösung

$C = a \cdot \frac{18}{430} \cdot (170-3)$ = gesamte zur Lösung benötigte Menge H_2O in /u l

Also sind zur 1 M KOH Lösung (C - b) /ul H_2O hinzuzufügen. In dieser KOH Lösung ist kristallisiertes H_3 ADP zu lösen. Es entsteht 0,3 M K_3 ADP Lösung.

2.6.3 Herstellung der Proben-Lösungen

Die zur Messung benötigten Ionenverhältnisse können durch einfache Mischung äquimolarer Lösungen im gewünschten Verhältnis erhalten werden. Hier soll nur ein etwas komplizierterer Fall wiedergegeben werden. Die Herstellung der Substanzen für die Messungen in Abschnitt 3 geht aus Tabelle 3 hervor. Es sollen Lösungen hergestellt werden, für die gilt:

$(ADP^{3-}):(PO_4{}^{3-}):(Mg^{2+}) = 1:1:1.$

Alle übrigen Kationen sind K^+; dies wird schrittweise durch H^+ ersetzt.

Ausgangssubstanz	Anteile äquimolarer (0,3 M) Lösungen					
$Mg_3\ ADP_2$	4	2	4	2	4	2
$K_3\ ADP$	2	1	2	1	2	1
$K_3\ PO_4$	3					
$K_2H\ PO_4$	3	3	3			
$KH_2\ PO_4$			3	3	3	
$H_3\ PO_4$					3	3
Protonierung:	1/2	1	1,5	2	2,5	3

Tabelle 3: Einstellung definierter Ionenverhältnisse

Die Protonierung gibt an, wie viele von den 6 Ladungen beider Anionen von Protonen besetzt sind,.

Die im Kapitel "Hydrolyse" behandelten Hydrolysegrade des ATP entstanden durch spontane Hydrolyse. Es wurde nur die gewünschte Ausgangsprotonierung wie oben hergestellt. 24 stündige Inkubation der Lösung bei 40°C erzeugte ein Weiterhydrolysieren von 5 - 10% des noch vorhandenen ATP. Die Hydrolyse ging in membranverschlossenen Flaschen vor sich. Zur Messung wurden jeweils ca. 10 µl der Lösung entnommen.

2.6.4 Umrechnung von Konzentrationsangaben

Für die Interpretation wie für die Planung von spektroskopischen Messungen in Lösung ist es nützlich,anzugeben, wie groß die Zahl n, die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle H, ist, die auf ein gelöstes Molekül A entfallen.

Bei der Herstellung der Lösungen benötigt man aber die Molarität einer Lösung. Folgende Betrachtung zeigt, wie die beiden Konzentrationsangaben ineinander umzurechnen sind.

1. Die Dichte ϱ wird gemessen
2. Betrachten wir nun die molekularen Größen:

V ist das Volumen, die das gelöste Molekül A und die n Lösungsmittel-Moleküle H einnehmen, die im Mittel auf es entfallen.

m_A sei die Masse eines Moleküls der Spezies A

m_H sei die Masse eines Moleküls des Lösungsmittels H

Dann gilt $\varrho = \frac{m_A + n \cdot m_H}{V}$ (1)

Dies läßt sich in Molekülargewichten ausdrücken,

also $\frac{M_A + n M_H}{V \cdot N_L}$. (1a)

(N_L: Loschmidtsche Zahl)

Die Anzahl der Moleküle A in 1 l Lösung beträgt 1/V (2)

Die Molarität x der Lösung ist definiert als:

$x = \frac{\text{Anzahl/Liter}}{N_L}$ (3)

Aus (2) und (3) folgt: $x = \frac{1}{V \cdot N_L}$

und mit (2): $x = \frac{\varrho}{M_A + n M_H}$ (4).

Wenn man also die Molekulargewichte des gelösten Stoffes und das des Lösungsmittels kennt, läßt sich aus der gemessenen Dichte der Lösung und der gewünschten Anzahl n die Molarität bestimmen.

2.7 Methoden der Massen- und Konzentrationsbestimmung

Die in den vorhergehenden Abschnitten gezeigten Möglichkeiten der quantitativen IR Messung bedürfen ergänzend genauer Methoden der Massen- bzw. Konzentrationsbestimmung.

2.7.1 Wägung und Elementaranalyse

Die Wägung der getrockneten kristallwasserfreien Substanz würde sofort die Lösung mit der richtigen Konzentration liefern.

Für - fast immer - vorhandenes Kristallwasser müssen jedoch Korrekturen angebracht werden:

Es sei m die Einwaage an kristallisierter Substanz in mg,
M das Molekulargewicht der Substanz ohne Kristallwasser,
n_o die Anzahl der gewünschten Moleküle H_2O/Molekül Substanz,
n_w die Anzahl der aus der Elementaranalyse ermittelten Kristallwassermoleküle pro Substanzmolekül.

Dann sieht man leicht folgende Beziehung für L, die Menge H_2O in µl, in der die eingewogene Substanzmenge zu lösen ist:

$$L = (n_o - n_w) \cdot \frac{18}{M} \left(m \cdot \frac{M}{M + 18 \cdot n_w}\right) \qquad (1)$$

Bei allen verwendeten Ausgangssubstanzen wurden Elementaranalysen durchgeführt. Es wurde jeweils eine Kohlenstoff- und eine Stickstoffanalyse gemacht, vgl. dazu auch die Anmerkung in Abschnitt 2.6.2.1.

Die Anzahl der H_2O Moleküle pro Molekül der gelösten Substanz n_w kann dann nach der Beziehung

$$A_c = \frac{12 \cdot n_c}{M + 18 \cdot n_w} \qquad (2)$$

ermittelt werden. Dabei ist A_c der in der Analyse ermittelte C Anteil, M das Molekulargewicht ohne Kristallwasser. n_c ist die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül, 12 und 18 sind die Molekulargewichte von Kohlenstoff und Wasser.

2.7.2 UV Methoden

2.7.2.1 UV Bande des Adenins

Die Konzentration an Adenin kann anhand der Extinktion E bei 260 nm bestimmt werden. Es gilt

$$c = \frac{1}{\varepsilon d} \cdot \frac{V}{v} \cdot E$$

Wir verwendeten Quarzküvetten mit einer Schichtdicke d = 0,5 cm. Die erforderliche Verdünnung V/v ist etwa $5 \cdot 10^3$ für 0,3 M Lösungen. ε variiert mit dem pH von 14,7 (pH = 1) bis 15,3 (pH = 14) $cm^2/\mu Mol$ (13). Alle Bestimmungen in dieser Arbeit wurden im pH Bereich 4 - 7 durchgeführt. In diesem Bereich variiert ε um etwa 2%. Die Bestimmung erfaßt die Gesamtkonzentration aller Adenosinphosphate.

2.7.2.2 Enzymatischer Test

Im Gegensatz zu der UV Bestimmung über die Bande bei 260 nm erfaßt die enzymatische Testmethode der Firma Boehringer die Einzelkonzentrationen an ATP, ADP und AMP. Diese Methode wurde zur Bestimmung des ATP Hydrolysegrades bei den Messungen in Abschnitt 3.4.3 benützt. Ihre biochemische Wirkungsweise ist in der Boehringer Testfibel (19) beschrieben. Es wird in jedem Fall stöchiometrisch $NADH^+$ erzeugt, dessen UV Absorption bei 366 nm ein Maß für die Konzentration ist. Da die Tests eigentlich für die Bestimmung von Adenosinphosphaten im Blut bestimmt sind, mußten einige Aenderungen angebracht werden.

Aenderungen der Testanweisungen

Die Enzymreaktionen laufen bei wesentlich stärkerer Verdünnung ab, als der 0,3 M Konzentration unserer Proben. Deswegen wurde beim ATP Test 1/100 und beim ADP/AMP Test 1/500 verdünnt.

Der Abschnitt "Enteiweißung" entfällt. Es stellte sich jedoch bei den Versuchen, die Bestimmung genau durchzuführen, heraus, daß die bei der Enteiweißung benötigten

Substanzen für die enzymatischen Reaktionen im richtigen Verhältnis anwesend sein müssen. Am besten bewährte sich das Verfahren, die Perchlorsäure im richtigen Verhältnis zu dem zur Verdünnung benötigten Wasser hinzuzufügen (Lösung O der Anweisung).

Es wurde mit 0,5 cm Küvetten gemessen. So läßt sich mit den jeweils halben Ansätzen arbeiten.

Modifizierte Vorschriften

Mit diesen Aenderungen ergeben sich folgende modifizierte Vorschriften:

ATP Test

10 µl der Probenlösung mit 5 ml Lösung O verdünnen.
In eine Küvette pipettieren:

Obige verdünnte Probenlösung:		100 µl
Lösung 1	:	1000 µl
Lösung 2	:	100 µl

mischen, E_1 messen

Suspension 3:		10 µl

mischen, nach 10 Min. E_2 messen

Lösung O	: H_2O bidest und 0,6 N Perchlorsäure 1:1 mischen

Für die Konzentration an ATP in der Probelösung gilt:

$$C = 1{,}83 \cdot \Delta E \text{ (mMol/ml)} \qquad (1)$$

ADP/AMP Test

5 µl der Probelösung mit 5 ml der Lösung O verdünnen;
in die verdünnte Lösung 1 ml der Lösung 1 geben;
10 Min. warten, gelegentlich rühren, dann abfiltrieren.

In eine Küvette pipettieren:

Filtrat	1000 µl
Lösung 2	100 µl
Lösung 3	100 µl
Suspension 4	10 µl

mischen, nach 5 Min. E_1 messen
Suspension 5
mischen, nach 5 Min. E_2 messen
Suspension 6
mischen, nach 15 Min. E_3 messen

(Lösung O : H_2O bidest und 1.O N Perchlorsäure 1:1 mischen).

Für die Konzentration an ADP gilt dann

$$C = 0{,}88 \cdot \Delta E \quad (\frac{mMol}{ml}) \qquad (2)$$

und für das AMP

$$C = 0{,}44 \cdot \Delta E \quad (\frac{mMol}{ml}) \; . \qquad (3)$$

Praktische Durchführung und Fehlerquellen

Die Vorschriften der Boehringer Anleitungen müssen besonders bezüglich der Reinigung der Gläser und der Temperatur der Lösungen bei den enzymatischen Reaktionen genau befolgt werden. Wenn die obigen Anweisungen eingehalten werden, laufen alle Reaktionen in den in der Testfibel angegebenen Zeiten quantitativ ab. Wenn jedoch der pH nicht im Neutralbereich liegt, führt dies zu großen Fehlern und Schleichreaktionen.

Die hauptsächliche Fehlerquelle bei den Bestimmungen liegt in der notwendigen sehr starken Verdünnung. Aus den Originallösungen wurden die benötigten Mengen deshalb mit einer SGE[+]) Mikrospritze entnommen, die nach jeder Benützung sogleich mit H_2O bidest gründlich ausgespült und mit der Vakuumpumpe getrocknet wurde. Wenn zwischen den einzelnen Schritten der Bestimmungen verschieden lange Zeiten liegen, beeinflußt dies das Ergebnis nicht. Da die Enzymreaktionen praktisch quantitativ ablaufen, ist auch die Zeit, die nach der Enzymzugabe bis zur Extinktionsmessung verstreicht, ohne wesentlichen Belang. Die in der Anweisung angegebene Zeit sollte aber nicht um mehr als 10 Minuten überschritten werden.

[+]) S.G.E. Scientific Glass Engineering PTY LTD
1-3 Baillie St. North Melbourne, Victoria/Australia

Leerwert und Meßgenauigkeit

Eine Leerwertbestimmung wurde bei den ATP und ADP Tests in periodischen Abständen durchgeführt. Ist der Leerwert nicht vernachlässigbar, muß auf eine Verunreinigung in den Testlösungen oder auf ungenügende Reinigung der Gläser geschlossen werden.

Die Prozentangaben der Hydrolyse in Abschnitt 3.4.3 haben eine absolute Genauigkeit von $\pm$ 2%. Eine Verbesserung der Genauigkeit konnte durch Interpolation der Hydrolysekurve erzielt werden. Es wurden also während der Hydrolyse nur in Abständen von $\geq$ 5% Tests durchgeführt. Eventuell dazwischen liegenden Messungen entsprechende Hydrolysegrade wurden durch Interpolation anhand der jeweiligen Inkubationszeit ermittelt.

2.7.3 Gravimetrische K^+ Bestimmung

Zur Ermittlung des Kaliumgehaltes der Proben wurde die Bestimmung durchgeführt, die vielfach noch unter dem Namen Kalignost-Bestimmung bekannt ist. Natriumtetraphenyloborat (Merck) bildet mit K^+ im Austausch gegen Na^+ einen Komplex. Dabei ist das Massenverhältnis K^+/Komplex = 0,109. Man führt eine Fällungsreaktion durch und wiegt den als Niederschlag erscheinenden unlöslichen Kaliumtetraphenyloborat-Komplex. Aus dem Ergebnis der Wägung und der bekannten Menge Adenosinphosphat läßt sich der Anteil an K^+ ermitteln.

Als Beispiel sei die Ueberprüfung des K^+ Gehaltes einer K_2H_2 ATP Lösung beschrieben:

a) Es wird eine Lösung von Natriumtetraphenyloborat hergestellt (Testlösung). Dazu werden 0,6 g in 100 ml Wasser gelöst. Diese Lösung ist 20 mM an Phenyloborat, eine Konzentration, die für den Test allgemein empfohlen wird.

b) Die ATP Konzentration der K_2H_2 ATP Lösung ist UV spektroskopisch zu 0,3 M ermittelt worden. Die K^+ Konzentration ist also mit ca. 0,6 M abzuschätzen. Es wird soviel von dieser Stammlösung zum Test verwendet, daß mit Sicherheit ein Ueberschuß an Phenyloborat bei der Reaktion verbleibt.

c) Es werden zur Reaktion gebracht:
20 ml Testlösung ≙ 400 /uMol Testsubstanz
200 /ul K_2H_2 ATP Lösung ≙ 120 /uMol K^+ (auf 40 ml verdünnt).
Es wird mit HCl angesäuert (pH = 2-3)

Der bei der Reaktion entstandene Niederschlag von Kaliumtetraphenyloborat wird in einer sehr kleinen Fritte (2 g, Feinheit D2) abgesaugt. Das Ergebnis der Wägung, mit dem Faktor 0,109 multipliziert, ergibt die K^+ Menge in mg.

Die Wasseraufnahme des getrockneten Rückstandes vor und während der Wägung, sowie die Bedeckung des Glases der Fritte mit H_2O aus der Luft kann zu großen Fehlern führen. Deshalb wurde die Fritte sowohl leer als auch mit Substanz vor jeder Wägung getrocknet und aus dem Wärmeschrank sofort in einen Exsiccator und darin zur Waage gebracht. Bei der Wägung wurde die Gewichtszunahme in Abständen von einer Minute beobachtet und auf den Zeitpunkt der Oeffnung des Exsiccators extrapoliert. Die Testlösung darf nicht in einem gewöhnlichen Glasbehälter aufbewahrt werden, da die Gefahr besteht, daß K^+ Ionen aus dem Glas herausgelöst werden.

Es lassen sich mit dieser Methode Mengen von ≥ 2 mg K^+ mit einem Fehler von ± 0,02 mg bestimmen.

2.7.4 Bestimmung des anorganischen Phosphats

Zusätzlich zu den anderen photometrischen Methoden benutzte ich die Bestimmung des anorganischen Phosphats durch Bildung des Ammoniummolybdat-Komplexes. Die durch

den Komplex verursache Färbung kann photometrisch (578 nm) ausgemessen werden. Sie ist bis zu einer P_i Konzentration von 150 /uM linear. Eichkurven wurden mit entsprechenden eingestellten Lösungen hergestellt. Der Test ist eine gebräuchliche Methode und kann aus Handbüchern der Biochemie, z. B. (20) entnommen werden.

3. Messungen, Befunde und ihre Deutung

3.1 Die polarisierbare Wasserstoff-Brücke

Wie schon in der Einleitung bemerkt, war einer der Gründe für diese Arbeit die Erwartung, daß beim ADP-ATP System auch eine Kontinuumsabsorption im IR Spektrum auftreten würde. Dieser Effekt gibt die Möglichkeit, molekulare Vorstellungen mit Wirkungen in biologischen Systemen in Verbindung zu bringen.

Wie der Abschnitt 3.4.3 zeigen wird, tritt das Kontinuum gerade bei der Hydrolyse des ATP in sehr definierter Weise auf. Dieser Abschnitt beschreibt, wie der Effekt heute auf der Grundlage von theoretischen Arbeiten über die zwischenmolekulare Wechselwirkung gedeutet wird.

Bei einer Reihe von Serien protonierter Substanzen in dieser Arbeit tritt eine recht kräftige Untergrundabsorption auf, die von der Protonierung der untersuchten Substanz abhängt. Diese kontinuierliche Absorption beginnt im Bereich der Valenzschwingungen der OH Brücken des Wassers und erstreckt sich häufig über den gesamten Bereich des Spektrums, manchmal jedoch auch nur bis etwa 1700 cm^{-1}.

Suhrmann und Breyer (21) fanden das Kontinuum schon 1933 im Bereich der IR Oberschwingungen. Arbeiten von Ackermann (22) sowie vor allem von Zundel et al. (23) - (26), (1), (10) wiesen es im Grundschwingungsbereich an vielen Systemen nach, die Wasserstoff-Brücken der Art $(BH\cdots B)^+$ und $(BH\cdots B)^-$ enthalten.

3.1.1 Die symmetrische H^+ Brücke mit Doppelminimumpotential

Betrachten wir zur Deutung des Effekts als Beispiel die Gruppierung $H_5O_2^+$ in einer symmetrischen Umgebung. Das in dieser Gruppierung vorhandene Ueberschußproton befindet sich in einem symmetrischen Doppelminimumpotential wie es in Abb. 13 dargestellt ist. Die Abbildung 12 zeigt die beiden Protonen-Grenzstrukturen, die die Verhältnisse zusammen beschreiben.

Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das Proton ist in den beiden Mulden des Potentials gleich.

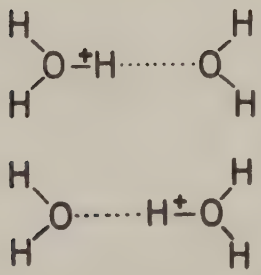


Abb. 12: Proton-Grenzstrukturen

Im Falle des $H_5O_2^+$ ist die Schwelle des Potentials niedrig. Dies läßt sich mit den sehr kleinen pK_a Werten +) des H_2O in Verbindung bringen. Diese Schwelle können die Protonen überwinden, auch dann, wenn ihre Energie niedriger ist als die Potentialschwelle. Man spricht dann bekanntlich vom Tunneleffekt.

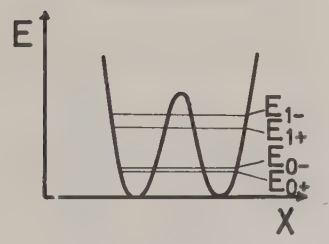


Abb. 13: Energieniveaus im Potential mit Doppelminimum

Der Tunnelvorgang ist die anschaulichere Formulierung der Aussage, daß im Doppelminimumpotential des $H_5O_2^+$ die Energiezustände des Protons in dieser Gruppierung aufgespalten sind (Abb. 13). Diese Aufspaltung allein ist noch nicht ausreichend, um die Kontinuität von Energieniveaudifferenzen zu erklären, die im IR Spektrum beobachtet wird. Diese Kontinuität folgt aus der Wechselwirkung der H^+ Brücke mit ihrer Umgebung.

+) pK_a Wert der Proton-Aufnahme

Weidemann und Zundel zeigten in mehreren Arbeiten, daß die H^+ Brücke auf dreierlei Art mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung tritt. Die Erklärung liegt in jedem Fall in der quantenmechanischen Eigenart des Systems (9a). Sein Grundzustand ist symmetrisch, der erste angeregte Zustand antisymmetrisch. Die Energie des angeregten Zustands unterscheidet sich nur sehr wenig von der des Grundzustandes, d. h. schon ein kleines elektrisches Feld kann eine Beimischung des angeregten Zustandes erzeugen. Es ist also leicht möglich, die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das Proton auf eine der beiden Seiten zu verschieben. Dies kann z. B. durch das elektrische Feld eines Anions geschehen. Damit ergibt sich eine sehr leichte Verschiebbarkeit des Ladungsschwerpunkts, oder - anders ausgedrückt - eine hohe Polarisierbarkeit.

Diese Polarisierbarkeit ist der Grund für folgende drei Wechselwirkungen, die geeignet sind, die Kontinuität von Energieniveaus hervorzurufen, deren Differenzen im IR Spektrum als Kontinuum beobachtet werden:

1) Kopplung der Tunnelbewegung über Korrelationskräfte; diese sogenannten Protonendispersionskräfte der Brücken untereinander hängen von deren Abstand und Orientierung sowie Umgebungseinflüssen, insbesondere der Dielektrizitätskonstante ab (10). Es treten Anziehungskräfte zwischen den Brücken auf, die einen Teil der elektrostatischen Abstoßung kompensieren.

2) Induktionswechselwirkung (9) (9a): sie ergibt sich aus der Betrachtung der Energieniveaus (Abb. 14). Das unterste Energieniveau wird abgesenkt, es handelt sich also ebenfalls um Anziehungskräfte.

3) Wechselwirkung der Uebergänge in den Brücken mit den Uebergangsmomenten von geeigneten, insbesondere zwischenmolekularen Schwingungen.

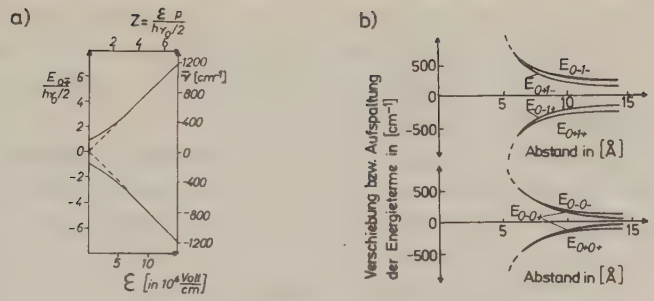


Abb. 14: a: Verschiebung der Energieniveaus E_{0+} und E_{0-} eines Tunnelprotons durch ein elektrisches Feld

b: Verschiebung bzw. Aufspaltung der Energieniveaus von zwei Tunnelprotonen durch die Protonendispersionskräfte

3.1.2 Unsymmetrische H^+ Brücken mit Doppelminimum

Eine H^+ Brücke ist unsymmetrisch, wenn Akzeptor und Donator unterschiedliche Basizitäten aufweisen. Hat der Akzeptor höhere Basizität, dann sieht der Potentialverlauf wie in der Abb. 15a aus. Wenn dagegen die Basizität des Donators überwiegt, dann gilt Abb. 15b, es tritt Protontransfer zum Akzeptor ein. x nimmt in Richtung vom Donator zum Akzeptor zu.

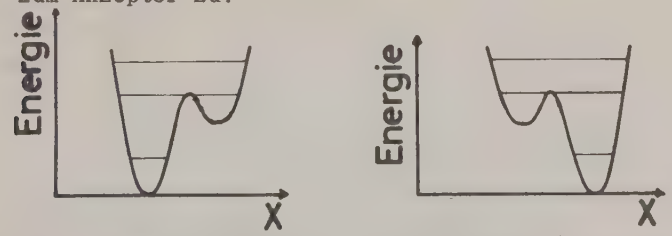


Abb. 15: Potentialverlauf in verschiedenen H^+ Brücken

Die unterschiedliche Basizität kann einerseits dadurch zustande kommen, daß es sich bei Akzeptor und Donator um verschiedene Atome handelt. Andererseits liegen

aber auch unterschiedliche Basizitäten vor, wenn die beiden Atome gleich sind, aber sich in unterschiedlicher chemischer Umgebung befinden. Bei verschiedener Basizität von Donator und Akzeptor treten bis zu einer gewissen Grenze ebenfalls noch Wasserstoff-Brücken mit Doppelminimum oder Wendepunkt im Potential auf.

Diese Brücken sind nicht mehr so leicht polarisierbar wie die symmetrischen, aber noch weit polarisierbarer als Elektronensysteme. Abb. 16 zeigt den Potentialverlauf bei

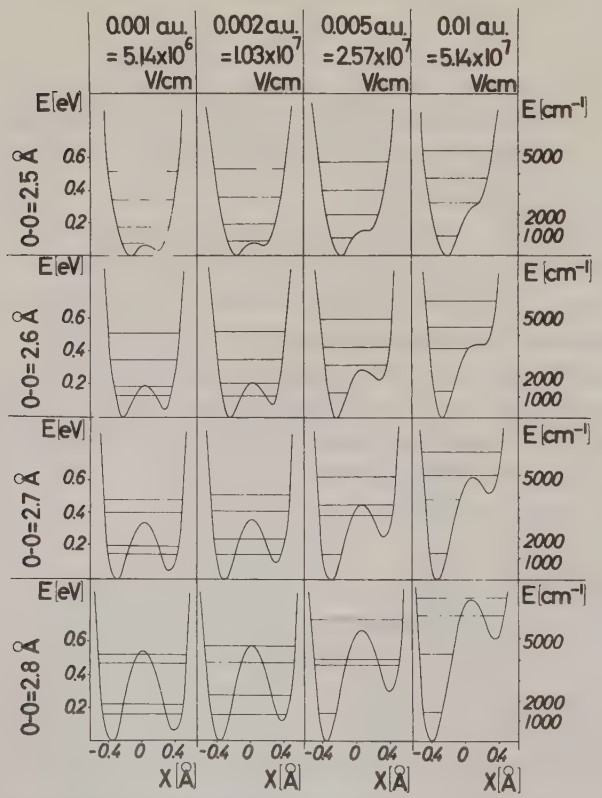


Abb. 16: Doppelminimum und Potentialverlauf bei verschiedenen Feldstärken und verschiedenen O-O Abständen (nach (9a))

symmetrischen Wasserstoff-Brücken, die im Einflußbereich eines elektrischen Feldes liegen. Man sieht hier nochmals recht anschaulich, wie die Kontinuität von Energieniveaudifferenzen im Fall des symmetrischen Doppelminimums zustande kommt. Weiter entnimmt man dieser Abbildung folgendes: im Fall der isolierten, unsymmetrischen Wasserstoff-Brücke mit Doppelminimum treten nur Uebergänge im Bereich größerer Wellenzahlen auf. Solche unsymmetrischen polarisierbaren Wasserstoff-Brücken verursachen damit Kontinua im Bereich von etwa 3000 bis 1700 cm^{-1} (9a). Mit den dargelegten Mechanismen ist das IR Kontinuum im molekularen Maßstab erklärt worden. Umgekehrt kann man aber auch aus der Art, in der das Kontinuum auftritt, auf diese Mechanismen schließen.

3.2 Uebersicht über die durchgeführten Meßreihen

Substanz (Anion)	Kationen	Konzentration H_2O/Anion	Abb.
PO_4^{3-}	$3K^+ \longrightarrow 3H^+$	60	17
ATP^{4-}	$2Na^+/2Na^+ \longrightarrow 2H^+$	60	20b
ADP^{3-}	$1Na^+/2Na^+ \longrightarrow 2H^+$	60	20a
ATP^{4-}	$2Na^+/2Na^+ \longrightarrow 2H^+$	feste Schicht	21b
ADP^{3-}	$1Na^+/2Na^+ \longrightarrow 2H^+$	feste Schicht	21a
ADP^{3-}	$1Mg^{2+}/K^+ \longrightarrow H^+$	170	22
(ADP^{3-} + PO_4^{3-})	$1Mg^{2+}/3K^+ \longrightarrow 3H^+$	170	24
ATP^{4-}	$Mg^{2+}/2K^+$, OH^+	170	26
ATP^{4-}	$Mg^{2+}/1,3K^+,0,7\ H^+$	170	28
ATP^{4-}	Mg^{2+}/K^+, H^+	170	30

A/B $\longrightarrow$ C soll bedeuten, daß das Ion A ständig vorhanden ist und daß B im Lauf der Meßreihe in C übergeführt wird.

Tabelle 4: Durchgeführte Meßreihen

3.3 Protonierte Einzelsysteme

3.3.1 Protonierung des PO_4^{3-} Ions in wäßriger Lösung

3.3.1.1 Die Banden

Zunächst werden die Banden der wäßrigen Lösung (60 H_2O/PO_4^{3-}) des anorganischen Phosphats im Bereich der PO Valenzschwingungen diskutiert, wie sie in den in Abb. 17 wiedergegebenen Spektren erscheinen. In einer weiteren Betrachtung wird dann der Verlauf des Kontinuums an zwei Punkten des Spektrums diskutiert. Die Zusammenschau beider soll eine Uebersicht bieten, welche Gruppierungen sich bei der schrittweisen Protonierung ergeben.

Die Zuordnung der Banden ist in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Im folgenden Text wird diese Zuordnung besprochen, ausgehend von unprotonierten PO_4^{3-} Ion (Lösung von K_3PO_4).

Für ein tetraedrisches Molekül wie das PO_4^{3-} sind vier Schwingungsformen möglich. Die totalsymmetrische PO_4^{3-} Valenzschwingung (942 cm^{-1}) ist bei 60 H_2O/PO_4^{3-} nicht IR aktiv, weil bei diesen Konzentrationen die tetraedrische Struktur des PO_4^{3-} Ions noch gut gewährleistet ist. ν_2 ist ebenfalls IR inaktiv, ν_4 liegt außerhalb unseres Meßbereichs. Die Bande der Schwingung ν_3 ist bei 1010 cm^{-1} in unserem Spektrum sehr stark ausgeprägt. Es ist die antisymmetrische PO_4^{3-} Valenzschwingung.

Bei 1083 cm^{-1} liegt die Bande der antisymmetrischen PO_3^{--} Schwingung. Die Tatsache, daß diese schon bei der unprotonierten Substanz auftritt, wenn wegen des in unserem Fall fehlenden KOH Zusatzes Wasserstoff-Brücken entstehen können [+]), zeigt die Bildung von Brücken der Art PO···HOH an, in denen Protonen zum Phosphation übergetreten sind. Dies ist im Hinblick auf den geringen Unterschied in den pK_a Werten verständlich. Es wird bei der Betrachtung des

---

[+]) Steger (27) hat bei der Messung vom K_3PO_4 in H_2O 46% des K_3PO_4 am KOH hinzugefügt. Er fand dann diese Bande nicht.

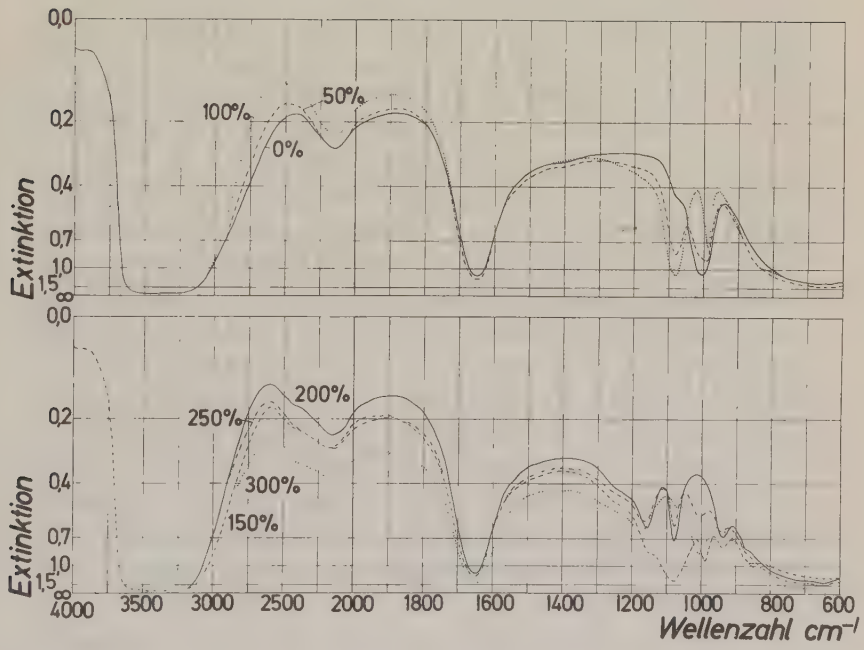


Abb. 17: Spektren der wäßrigen Lösung des schrittweise protonierten PO_4^{3-} Ions. Konzentration: 60 H_2O/PO_4^{3-} Schichtdicke: 13 /u

Verlaufs der Kontinuumsabsorption mit der Protonierung von Bedeutung sein, daß solche Brücken gebildet werden.

Vom 100% protonierten PO_4^{3-} Ion an erscheint die Bande bei 1083 cm^{-1} sehr deutlich, zusammen mit der symmetrischen Valenzschwingung bei 990 cm^{-1}. Bei etwa 850 cm^{-1} erscheint die Valenzschwingung der P-OH Schwingung. Die PO_3^{--} Deformationsschwingungen werden bei Frequenzen unter 600 cm^{-1} gefunden. Außerdem zeigt sich beim 100% protonierten PO_4^{3-} erstmals eine breite schwache Bande im Bereich um 2400 cm^{-1}. Steger und Herzog (27) haben diese Bande in sehr konzentrierter Lösung vermessen und lokalisieren sie bei 2380 cm^{-1}. Die dazugehörende Ramanlinie finden sie bei 2350 cm^{-1}. Den Unterschied bei den beiden Messungen führen die Autoren darauf zurück, daß die IR und die Ramanmessung bei voneinander verschiedenen Temperaturen gemacht werden mußten. Die Temperaturabhängigkeit und die Tatsache, daß die Bande im tiefen OH Valenzschwingungsbereich liegt, zeigt die Bildung von starken Wasserstoff-Brücken zwischen den Phosphaten an. Eine Bestätigung erhält dieser Schluß durch das Auftreten einer Ramanlinie bei 930 bis 940 cm^{-1}, die der totalsymmetrischen Pulsation des PO_4^{3-} entspricht. Sie wird von Steger und Herzog so gedeutet, daß ein Bindungsausgleich über die wasserstoffverbrückten Phosphate hinweg stattfindet, so daß die stärkste Ramanlinie des PO_4^{3-} Tetraeders bereits schwach hervortreten kann.

In der Darstellungsweise des Abschnitts 3.1 ergibt sich folgendes: In den starken H^+Brücken zwischen den Phosphaten ist ein hoher Wall im Doppelminimumpotential vorhanden, wenn der pK_a Wert an der Stelle der Brücke ≈ 12 ist. Dies ist ja in diesem Stadium der Protonierung der Fall, weil das PO_4^{3-} sonst noch unprotoniert ist (wegen der pK_a Werte vgl. Abschnitt 3.4.2). Wegen dieses hohen Walles ist das Proton auf einer Seite der H^+ Brücke festgehalten; so enthält die Kette der Phosphationen Glieder, die die oben erwähnte Schwingung des unprotonierten Moleküls ausführen können.

Für das 200% protonierte Phosphat erscheinen erwartungsgemäß vier Banden im Spektrum. In Uebereinstimmung mit Ramandaten werden die Banden bei 1160 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} der antisymmetrischen und symmetrischen Valenzschwingung des $>P\lesssim^{O}_{O}$ zugeordnet, die Banden bei 942 und 872 cm^{-1} der Gruppierung $>P\lesssim^{OH}_{OH}$. Diese Zuordnung findet sich auch bei Chapman und Thirlwell (28).

Die Zuordnung des H_3PO_4 in wäßriger Lösung ist ebenfalls von Chapmann (28) aus IR und Ramandaten, die in H_2O und D_2O Lösung aufgenommen wurden, gegeben worden. Die Bande bei 1250 cm^{-1} ist danach auch beim H_3PO_4 der POH in plane Deformationsschwingung zuzuordnen. Sehr stark tritt bei 1180 cm^{-1} die Bande hervor, die der P=O Schwingung zugeschrieben wird. Bei 1070 cm^{-1} liegt die antisymmetrische Valenzschwingung des $P(OH)_3$, ihr symmetrisches Gegenstück erscheint bei 880 cm^{-1}. Die stärkste Bande ist die zugehörige PO Valenzschwingung bei 1005 cm^{-1}. Deutlich wird beim H_3PO_4 die Bande bei 2380 cm^{-1}. In diesem Fall sind starke Wasserstoff-Brücken die Ursache, die zu den Wassermolekülen der nächsten Umgebung gebildet werden. Dies gibt zur Bildung von $H_5O_2^+$ Gruppierungen Anlaß, da Proton-Transfer zum H_2O eintritt. Das zeigt sich sehr deutlich am Verlauf der Kontinuumsabsorption, die im nächsten Abschnitt besprochen wird.

In Tabelle 5 ist die Zuordnung für das PO_4^{3-} wiedergegeben.

3.3.1.2 Der Verlauf der Kontinuumsabsorption mit der Protonierung

In Abb. 18 ist die Extinktion des Untergrundes für zwei verschiedene Wellenzahlwerte wiedergegeben. Deren Verlauf mit der Protonierung ist durch die Bildung verschiedener polarisierbarer Wasserstoff-Brücken im Wechsel der durch die Protonierung verursachten Gruppierungen zu erklären. Die in Abb. 18 an der Ordinate aufgetragenen

Kation: K^+, H^+ Bei der Zuordnung benutzte Literatur ist im Text angegeben

	Zuordnung	Bandenlage cm^{-1}
K_3PO_4	ν_3	1010
	ν_1	942 (nach Störung der Symmetrie)
	ν_2	inaktiv
K_2HPO_4	ν O-H···O	2400
	ν_{as} $-P(=O)(-O)-O$	1083
	ν_s $-P(=O)(-O)-O$	990
	ν_s P-OH	850
KH_2PO_4	ν O-H···O	2400
	ν_{as} $>P(=O)(-O)$	1160
	ν_s $>P(=O)(-O)$	1080
	ν_{as} $>P(-OH)(-OH)$	942
	ν_s $>P(-OH)(-OH)$	872
H_3PO_4	δ P-O-H (in plane)	1250
	ν P=O	1180
	ν_{as} $=P(-OH)(-OH)-OH$	1070
	Stretching PO	1005
	ν_s $=P(-OH)(-OH)-OH$	880

Tab. 5: Zuordnung der Banden des PO_4^{3-} Ions

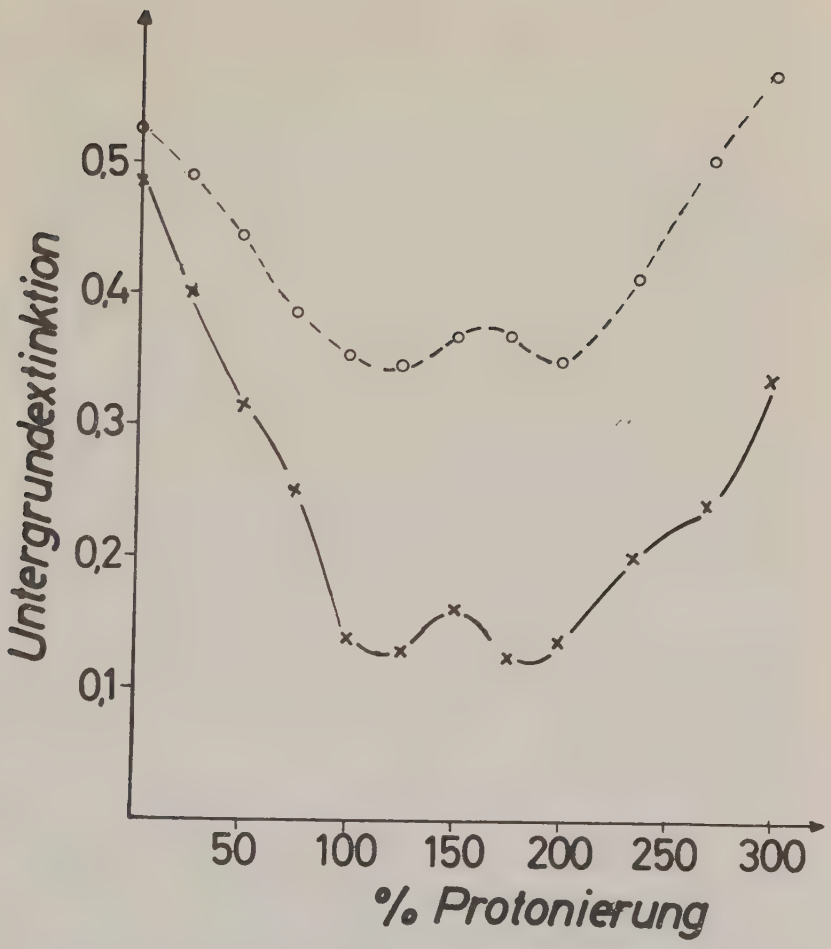


Abb. 18: Verlauf der Untergrundextinktion mit der Protonierung: PO_4^{3-} Ion in wäßriger Lösung 60 H_2O/PO_4^{3-} Schichtdicke 30 /u . x 2400 cm^{-1}, O 1900 cm^{-1}

Werte lassen sich nicht aus den Spektren der Abb. 17 entnehmen, weil sie mit einer Schichtdicke von ca. 30 /u aufgenommen worden sind. Bei der Schichtdicke von 13 /u lassen sich die Banden im Spektrum gut erkennen, jedoch stößt eine quantitative Messung der IR Extinktion beim PO_4^{3-} Ion auf große Schwierigkeiten, wenn man in den Bereich des dritten Protonierungsschrittes kommt. Die Benetzbarkeit der Küvettenflächen wird sehr schlecht, weshalb dünne Schichten der Probenlösung zwischen ihnen nicht mehr stabil und reproduzierbar bleiben. So wurden die in Abb. 18 gezeigten Extinktionen an Hand einer geänderten Küvette gemessen. Damit liessen sich reproduzierbare Extinktionswerte gewinnen. Die Veränderung der Banden (Abb. 17) bei der Protonierung ist für die Deutung mit herangezogen worden. Beim PO_4^{3-} Ion läßt sich auch der Bereich unter 1900 cm^{-1} bezüglich der Untergrundabsorption untersuchen, weil nur noch wenige Banden in diesem Bereich auftreten. Eine Messung der Untergrundabsorption im Bereich um 1400 cm^{-1} zeigt, daß hier spezielle Effekte auftreten, die von den bei den beiden anderen Wellenzahlen beobachteten abweichen. Im Rahmen dieser Arbeit ist nicht geklärt worden, ob es sich bei diesen Effekten um den Einfluß von Banden oder um bisher unerklärliche Untergrundeffekte handelt. Es wird wie beim ADP bzw. ATP nur die Untergrundabsorption bei den Wellenzahlenwerten 2400 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} betrachtet.

Im folgenden sind die bei den einzelnen Protonierungsgraden hauptsächlich zu erwartenden Gruppierungen gezeigt und dem Bild der Spektren gegenübergestellt.

Die charakteristischen Grundzüge des Verlaufs der Untergrundextinktion mit der Protonierung sind für beide Wellenzahlwerte

a) ein starker Abfall im ersten Protonierungsschritt bis ca. 100% Protonierung
b) ein Maximum bei 150 - 180%
c) ein starker Anstieg ab ca. 200%.

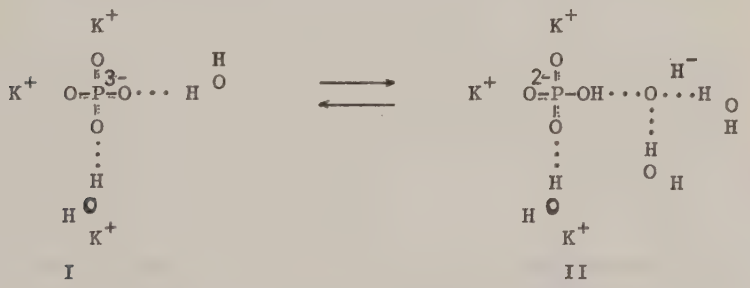
Es treten jedoch auch deutliche Unterschiede für die beiden Wellenlängen auf. Diese Unterschiede erst und die den oben besprochenen Bandenlagen und Intensitäten zuzuordnenden Gruppierungen führen zur Erkennung des jeweils wirksamen Mechanismus.

Betrachten wir zunächst den Bereich der Protonierung von 0 - ca. 120%.Dann ergeben sich für die Differenz zwischen dem Extinktionswert bei 0% und dem bei 120% folgende Werte:

2400 cm^{-1} : Δ Ext. = 0,380
1900 cm^{-1} : Δ Ext. = 0,170

Die bei 0% Protonierung vorliegende Gruppierung erzeugt also eine stark wellenzahlabhängige Untergrundextinktion. Mit der Protonierung muß diese Gruppierung verschwinden.

Die möglichen Strukturen und H^+ Brücken sind beim unprotonierten PO_4^{3-} Ion:

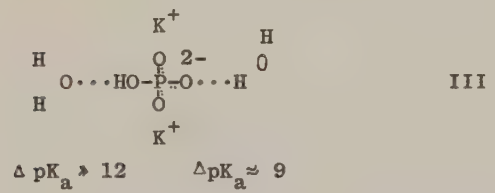


I II

Wie in Abschnitt 3.1.2 gezeigt worden ist, tritt im Bereich großer Wellenzahlen (Bereich 3000 cm^{-1} - 1700 cm^{-1}) eine wellenzahlabhängige Kontinuumsabsorption für unsymmetrische Potentiale auf. Ein derartiges Kontinuum wurde von Sessler (5) an wäßrigen Lösungen von Lysidin, Piperidin und Propylamin gefunden, die ebenfalls einen pK_a Wert von $\approx$ 10 aufweisen. Daß auch die Gruppierung II beteiligt ist,

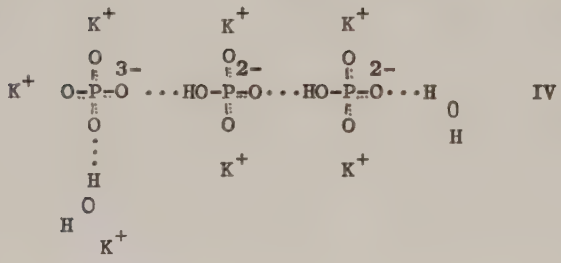
folgt aus dem Befund, daß die Bande des einmal protonierten PO_4^{3-} Ions bei 1080 cm^{-1} schon beim unprotonierten PO_4^{3-} als Schulter vorhanden ist.

Wenn überschüssige Protonen in das Gleichgewicht eingebracht werden, bilden sich neben den Gruppierungen I und II weitere Anordnungen aus. Es sind folgende Gruppierungen zu erwarten:



III

$\Delta pK_a \gg 12$ $\Delta pK_a \simeq 9$

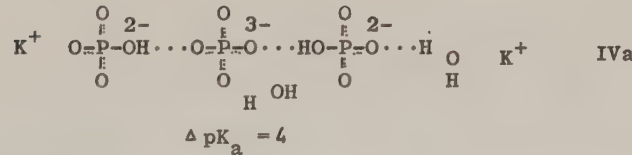


IV

Gruppierung III ist das isolierte, einmal protonierte PO_4^{3-} Ion. Das Auftreten der Gruppierung IV ist in Abschn. 3.3.1.1 schon im einzelnen begründet worden. Die in Gruppierung III gebildeten H^+ Brücken haben wegen der großen pK_a Differenzen bei Akzeptor bzw. Donator stark unsymmetrische Potentiale. In ihnen ist keine Kontinuität der Energiewerte mehr möglich; die OH Valenzschwingung dieser Brücken liegt in dem breiten Bandenkomplex oberhalb 3000 cm^{-1} (1). Ebenso hat Sessler gezeigt, daß symmetrische Brücken zwischen den Akzeptoren und Donatoren mit sehr großem pK_a,

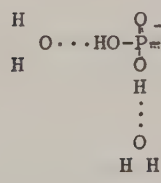
wie sie in Gruppierung IV auftreten, in wäßrigem Milieu ebenfalls keine Kontinuität der Energiewerte mehr aufweisen (5). Deshalb wird weder bei Gruppierung III noch bei IV ein Kontinuum beobachtet.

Wenn die Gruppierungen I und II nicht mehr möglich sind, wird die Kontinuumsabsorption auf ein Minimum abnehmen. Dieses Minimum tritt wegen der Assoziatbildung IV erst bei höherer Protonierung als 100% auf. Betrachten wir hierzu IVa. Hier ist die Gruppierung IV in einem ebenfalls möglichen, hinreichend lange stabilen Zustand dargestellt, in dem ein Phosphat der Kette kein Proton besitzt. Dann kann zum H_2O eine Brücke gebildet werden, und ein Kontinuum wird auch über 100% mittlere Protonierung hinaus beobachtet.



$\Delta pK_a = 4$ IVa

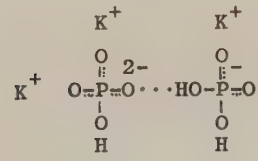
Betrachten wir nun die Gruppierungen, die der zweite Protonierungsschritt mit sich bringt. Zunächst ist das isolierte, zweimal protonierte $H_2PO_4^-$ Ion mit C_{2v} Symmetrie zu erwarten:



V

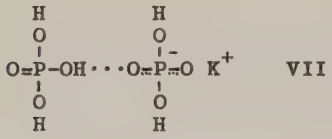
Wie das Maximum des Kontinuums bei 150% zeigt, liegen jedoch auch in diesem Protonierungsbereich Gruppierungen mit polarisierbaren Wasserstoff-Brücken vor. Es handelt sich dabei um Gruppierungen der Art VI. Sind diese Gruppierungen

von ihrer Umgebung isoliert, so besteht in ihnen ein Doppelminimumpotential.



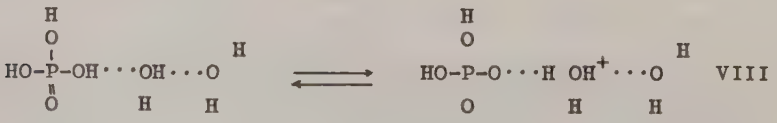
VI

Nach Sessler (5) ist dann, wenn die pK_a Werte um 7 liegen, die Tunnelfrequenz noch so groß, daß derartige stark polarisierbare Wasserstoff-Brücken auch im wäßrigen Milieu - wie beobachtet - ein Kontinuum verursachen. Wenn über 200% hinaus protoniert wird, entsteht zunehmend folgende Gruppierung:



VII

Im Protonierungsbereich um 250% zeigt sich der typische Verlauf der Kontinuumsabsorption, der von Sessler bei Substanzen mit $pK_a \approx 3$ beobachtet wurde. Wie in seiner Arbeit (5) näher erläutert wird, ist der steile Anstieg am Ende auf die zunehmende Ausbildung von $H_5O_2^+$ Gruppierungen zurückzuführen. Deren Auftreten hatte sich ja im vorigen Abschnitt (3.3.1.1) auch aus der Betrachtung der Banden ergeben. Es kann durch ein Gleichgewicht der Art VIII dargestellt werden.



VIII

3.3.2 Das Na^+ Salz des ADP bzw. ATP

Das "freie" Molekül

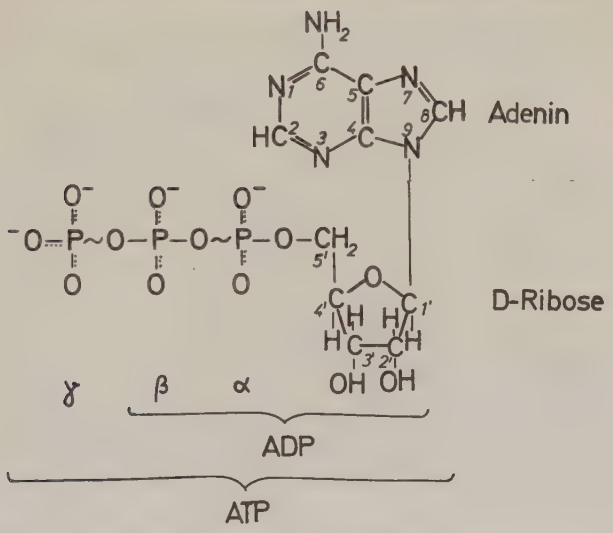


Abb. 19: Das ATP und das ADP Molekül

Abb. 19 zeigt das ADP und das ATP Anion. Es liegt in diesem quasifreien Zustand vor, wenn man das kristallisierte Natriumsalz in reinem H_2O löst und stark verdünnt. (Zur Definition des freien Zustandes im Gegensatz zum komplexgebundenen vgl. Abschnitt 3.3.3.5).

3.3.2.1 Die pK_a Werte

Der negative dekad.Logarithmus der Dissoziationskonstante eines Protons an einer bestimmten Stelle (Akzeptor) eines in wäßriger Lösung mit 1 M Konzentration gelösten Moleküls ist bekanntlich als der pK_a Wert des Moleküls an dieser Stelle definiert (vgl. 3.4.2.3). Die beiden niedrigsten pK_a Werte des ADP bzw. ATP werden bei uns keine Rolle spielen. Der nächstfolgende pK_a=4 und der pK_a= 6,5 sind durch spektroskopische Methoden eindeutig dem N_1 am Basen-

ring und der endständigen PO_3 Gruppe zugeordnet worden (29). Diese pK_a Werte gelten nur für sehr verdünnte wäßrige Lösungen der reinen Substanz.

Da das H_2O einen pK_a Wert für die Abgabe eines Protons von 15,8 besitzt, wird sich das Molekül nur vernachlässigbar protonieren, solange es in reiner wäßriger Lösung vorhanden ist. In dieser Arbeit wurde die Protonierung des Probenmoleküls nicht durch Verschiebung des pH mittels Zugabe von stark oder schwach dissoziierenden Stoffen (Titration) gesteuert, weil die Zugabe von Fremdionen die Ergebnisse der spektroskopischen Messungen völlig undurchschaubar machen kann. Wir stellten die Protonierung durch entsprechende Anteile protonierter Probensubstanzen her, d. h. durch Mischung von Salz und Säure. Ein Beispiel dafür ist in Abschnitt 2.6.3 gegeben. Da sich alle Messungen auf die pH Werte 4 - 7 beziehen, ist der Beitrag des H_2O zur Protonierung an allen interessierenden Akzeptor-Stellen vernachlässigbar.

Akzeptor		ADP	ATP
Phosphat	(α	1	1
	(ß	2	1
	(γ	-	2
Base(N_1)		4,0	4,0
endständiges Phosphat (ß bzw. γ)		6,0	6,5
Ribose (C)		12,0	12,0

Tabelle 6: pK_a Werte des ADP und des ATP

Phillips (29) gibt einen Ueberblick über die mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Werte. Die Werte streuen in der Literatur um etwa ± 0,3 um die obigen Angaben.

3.3.2.2 Zuordnung der Banden

Lubos (12) und Kölkenbeck (30) geben in ihren Dissertationen die Zuordnung der Banden des Poly A, die dem jeweiligen Stand der Forschung auf diesem Gebiet entspricht.

Die genaue Zuordnung aller Banden ist bis heute nicht gelungen, weder für das Poly A noch für die Adenosinphosphate. Im folgenden sind im wesentlichen nur die Banden des ATP und des ADP gemeinsam behandelt, die für die Interpretation der Messungen dieser Arbeit von Bedeutung sind.

Der Bereich 4000 - 1800 cm^{-1}

3370 cm^{-1} Dieses Bandenpaar entspricht den Valenzschwingungen der

3200 cm^{-1} H^+ brückengebundenen NH Gruppen, die mit der Oberschwingung der $-NH_2$ Scherenschwingung koppeln.

Die im Bereich 3000 - 2500 cm^{-1} nur schwach ausgeprägten Banden sind CH Schwingungen der Ribose und der Base zuzuordnen.

2370 cm^{-1} Diese Bande entspricht der beim PO_4^{3-} Ion gefundenen. Sie ist der v (PO-H) Schwingung zuzuordnen. Die Unterschiede in der Intensität dieser Bande sind in Abschnitt 3.3.2.4 diskutiert.

Der Bereich der Ringschwingungen (1800 - 1500 cm^{-1})

Die Banden in diesem Bereich sind den in plane Schwingungen der Base mit überwiegendem Valenzschwingungscharakter und der Scherenschwingung der $-NH_2$ Gruppe zuzuordnen.

Für die weiteren Betrachtungen ist es wesentlich, daß sich die Protonierung des N_1 der Base (Abb. 19) in der Bande bei 1690 cm^{-1} deutlich zu erkennen gibt. Diese Bande kann als Maß für die Protonierung des Basenrestes dienen. In verdünnter wäßriger Lösung (Abb. 20) erscheint sie allerdings nur als schwache Schulter neben der H_2O Scherenschwingung, die bei 1640 cm^{-1} liegt. Sehr empfindlich auf Protonierung reagieren die beiden Banden bei 1510 cm^{-1} und 1480 cm^{-1}. Beim unprotonierten Molekül ist immer die Bande bei der kleinen Wellenzahl vorhanden, die andere nur als Schulter. Wenn sich der Basenring voll protoniert hat, ist das Ver-

hältnis genau umgekehrt. Die beiden Banden sind ebenfalls Ringschwingungsmoden zuzuordnen.

Der Bereich der Phosphatbanden (1300 - 800 cm^{-1})

Die Zuordnung der PO Banden des ADP bzw. ATP Anions ist, ausgehend von der Arbeit von Epp et al. (31) durch Brintzinger sehr vervollkommnet worden. Brintzinger (32) gibt eine Zuordnung für die Banden des unprotonierten und des einfach protonierten ATP. Eine Tabelle (Nr. 7 am Ende dieses Abschnitts) verwertet diese Ergebnisse und gibt einen Zusammenhang mit den vergleichenden Betrachtungen im nächsten Abschnitt. Dafür sind insbesondere bereits die Erkenntnisse über die durch Protonen verursachen Umordnungen in 3.3.2.3 verwendet worden.

Die Banden unter 900 cm^{-1}

Unter 900 cm^{-1} sind nur noch Banden vorhanden, die in der wäßrigen Lösung nicht mehr hervortreten. Sie sind daher nur in Abb. 21 zu sehen. Hier ist eine eindeutige Zuordnung noch nicht durchgeführt worden. Es läßt sich nur allgemein angeben, daß in diesem Bereich hauptsächlich out of plane Ringschwingungen der Ribose und Basenreste auftreten.

Von großer Bedeutung wird bei den Betrachtungen zur Hydrolyse die breite, bisweilen aus vielen Einzelbanden bestehende Absorption der gehinderten Torsion des H_2O sein. Ihr Maximum liegt im Bereich 700 - 650 cm^{-1}.

3.3.2.3 Vergleichende Betrachtung von ADP und ATP in Lösung

Man gelangt formal vom ADP zum ATP durch Addition einer dritten Phosphat-Gruppe über eine POP Diesterbindung. Wie man beim Spektrum des unprotonierten ATP am besten erkennt (Abb. 20a), ist deshalb die ν_{as} P-O-P Bande um den Faktor 1,3 intensiver als beim ADP. Die stärkere Aufspaltung der ν_{as} $-PO_3^{--}$ Schwingung (1120 cm^{-1}) und insbesondere die viel schwächere Verschiebung der ν_{as} PO_2^- Schwingung (1235 cm^{-1})

mit der Protonierung geben zusammen eine Möglichkeit, ATP und ADP in den Spektren voneinander zu unterscheiden, Die Protonierung läuft bei beiden Molekülen in der gleichen Weise ab. Die Protonierung der Phosphatgruppe ist gegenüber der der Base deutlich abgegrenzt. Die in unserer verdünnten Lösung recht gut definierten pK_a Werte von 6,5 bzw. 4,0 entsprechen der Protonierung der endständigen Phosphatgruppe bzw. der des N_1 Atoms der Base. Diese beiden Plätze werden der Reihe nach durch das erste und das zweite Proton besetzt. Für das unprotonierte ADP ist die Schwingung ν_{as} $-PO_3^{--}$ (1120 cm^{-1}) vollständig entartet (Abb. 20a). Die Bande $\nu_s > PO_2^-$ (1080 cm^{-1}) erscheint nur als schwache Schulter, wogegen sie beim ATP recht deutlich hervortritt. Dies entspricht einfach der Tatsache, daß das ATP eine PO_2^- Gruppe mehr enthält. Die Protonierung am endständigen Phosphat äußert sich vor allem in einer typischen Veränderung in diesem Bereich von 1120 bis 1080 cm^{-1}. Die Absorption bei 1120 cm^{-1} geht zurück, damit gleichlaufend wächst die Bande um 1080 cm^{-1}. Beim ATP ist diese Bande zusätzlich aufgespalten. Dieses Bild entspricht dem Prozeß, daß sich durch das Proton die Gruppierung $-P(=O)(-O^-)_2^{2-}$ in die Gruppe $-P(=O)(-O^-)(-OH)^-$ umwandelt. In Tabelle 7 sind die Verhältnisse in einer Uebersicht dargestellt.

Die Vorgänge im Bereich um 1000 cm^{-1} sind, wie auch Brintzinger (32) bemerkt, nur schwach zu erkennen und nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Die Bande der Schwingung $\nu_{as} > PO_2^-$ im Bereich um 1230 cm^{-1} wird durch das Proton ebenfalls mit beeinflußt, was beim ADP wiederum sehr viel deutlichere Wirkungen hervorruft. Beim zweiten Protonierungsschritt zeigen sich im Bereich der PO Schwingungen keine Veränderungen mehr. Nun erscheint mit anwachsender Protonierung die Bande, die entsteht, wenn man den Basenring am N_1 protoniert (1690 cm^{-1}).

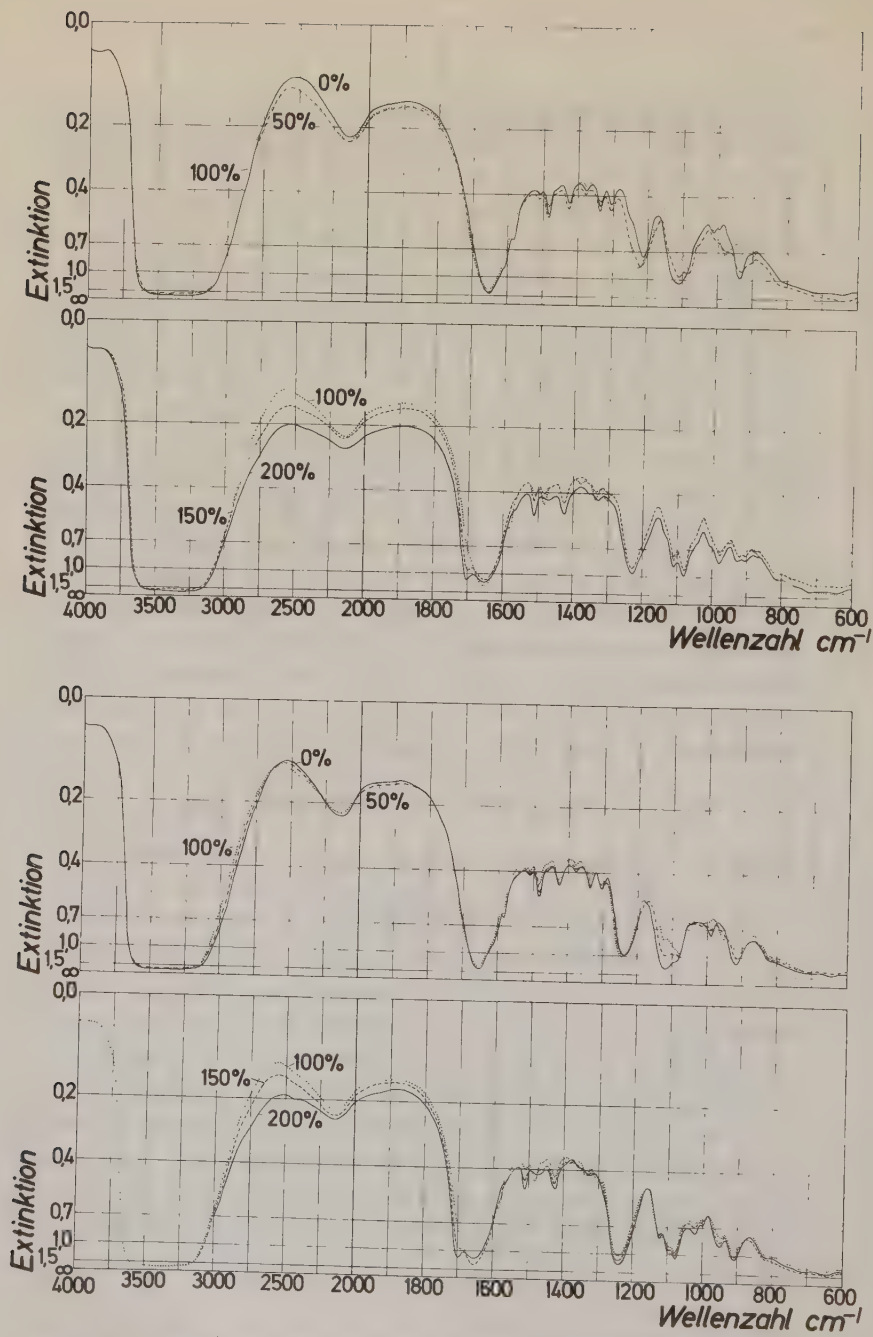


Abb. 20: Spektren der wäßrigen Lösung von schrittweise protoniertem ADP^{3-} bzw. ATP_4^-; Konz. 60 H_2O/Adenosin
a: ADP b: ATP

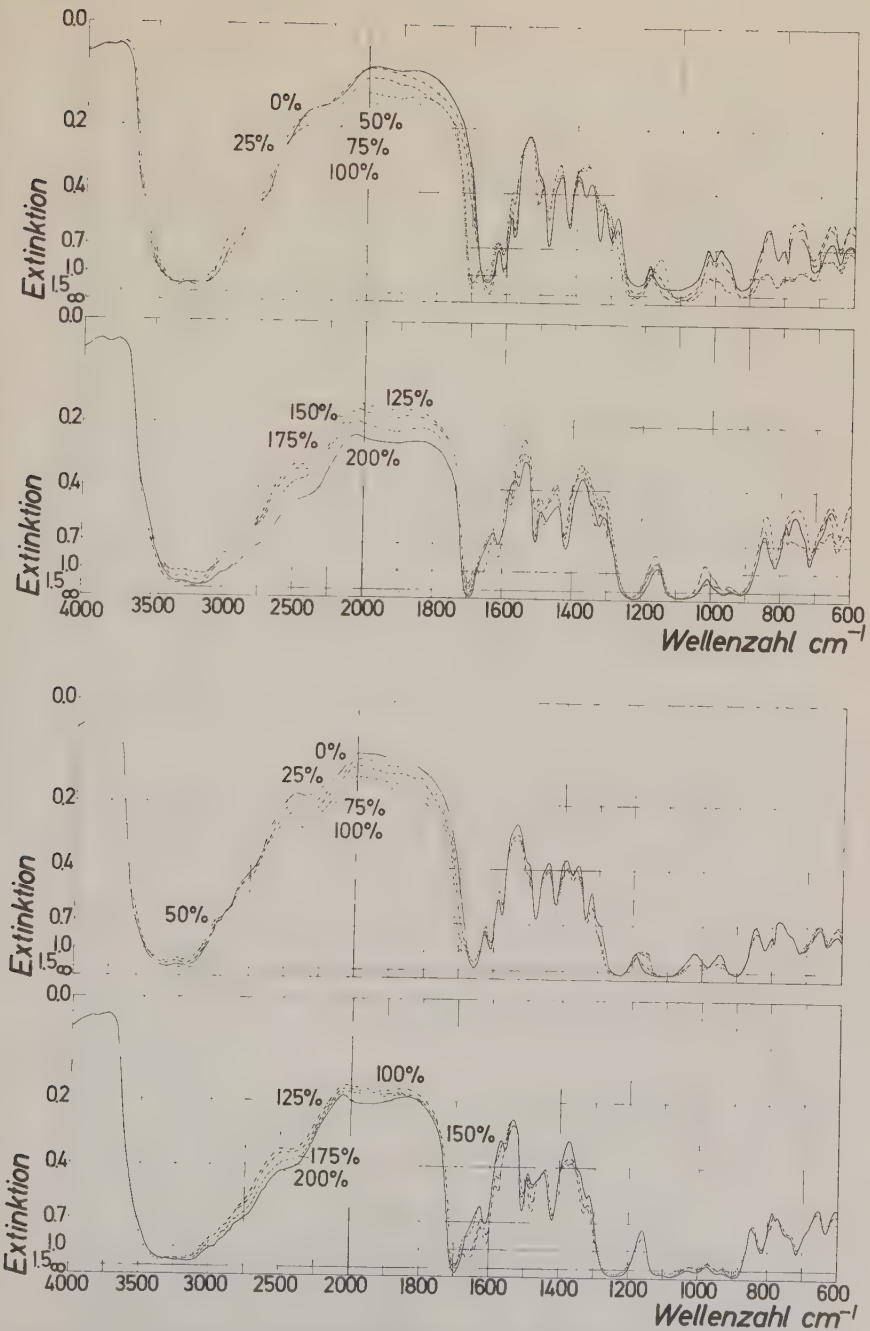


Abb. 21: Spektren der hydratisierten Schicht von ADP^{3-} bzw. ATP^{4-} Konz. 60 H_2O/Adenosin
a: ADP b: ATP

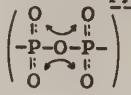
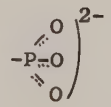
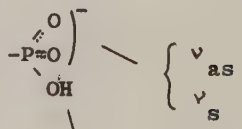
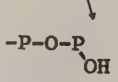
Anion				Anion + H^+	
Bandenlage (cm^{-1})				Bandenlage (cm^{-1})	
ATP	ADP			ATP	ADP
1235	1213	ν_{as}		bleibt erhalten, aber Kopplung: 	1240 1225
1085	verdeckt	ν_s		Aufspaltung der Bande bei 1080 cm^{-1} nur beim ATP	1095 1080 1080
1120	1112	ν_{as}			1120
990	1020	ν_s			≈1000 ≈1000
920	940	ν_{as}	P-O-P-		955 990
830	820	ν_s			905 940 830 820

Tabelle 7: Bandenlagen und Zuordnungen für das ATP bzw. ADP in wäßriger Lösung (60 H_2O)

Während das Proton am Phosphat wegen des höheren pK_a Wertes keine sehr deutliche Kontinuumsabsorption hervorruft (5), tritt in der zweiten Stufe dieser Effekt recht ausgeprägt auf. Wenn man die starke Verdünnung in Rechnung stellt, ist der Kontinuumseffekt in der gleichen Größenordnung wie der von Sessler am Purin gefundene (6).

3.3.2.4 Die Spektren der hydratisierten Schichten

Betrachten wir nun zum Vergleich die Spektren der Lösungen (Abb. 20) und die der Schichten (Abb. 21) +). Die Schichten wurden bei 7% Luftfeuchtigkeit hergestellt. Sie weisen einen grundlegenden Unterschied gegenüber denen des ADP bzw. ATP in wäßriger Lösung auf: In der Schicht werden die Eigenschaften der Protonenakzeptoren offensichtlich so verändert, daß sich Phosphatgruppe und Ring parallel protonieren. Die scharfe Unterscheidung zwischen der Protonierung des Phosphats und der des N_1, die in der Lösung zutage trat, ist hier völlig aufgehoben. Das gilt für ATP und ADP gleichermaßen, jedoch ist beim ADP die Ringprotonierung bevorzugt. Man erkennt deutlich, daß die Bande bei 1690 cm^{-1}, die die Ringprotonierung anzeigt, für 100% Protonierung beim ADP bereits viel deutlicher hervor tritt als beim ATP (Abb. 20a und 21a). Da das Verhältnis der Bindungskonstanten für das Proton an den beiden Bindungsplätzen in verdünnter Lösung $5 \cdot 10^2$ beträgt, werden die pK_a Werte offensichtlich bei wachsender ADP bzw. ATP Konzentration durch starke Wechselwirkungseffekte aneinander angeglichen. Es ist bekannt, daß die Protonenbindungskonstanten vom Hydratationsgrad abhängen.

Gemessen an der hohen ATP Konzentration ist der beobachtete Kontinuumseffekt recht schwach. Die Ausbildung der das

+) Der Bereich der Phosphatbanden ist bei der relativ großen Schichtdicke, bei der die Spektren in Abb. 21 wegen der Reproduzierbarkeit aufgenommen wurden, nicht sehr gut zu erkennen, weil die Absorption hier zu groß wurde. Dieselben Spektren wurden mit dünnerer Schicht gemessen, um die Aussagen über die Phosphatbanden abzusichern. Mit diesen Schichten war allerdings keine Reproduzierbarkeit der Schichtdicke und damit der Kontinuumsmessung mehr zu erreichen.

Kontinuum erzeugenden polarisierbaren Wasserstoff-Brücken scheint in der wäßrigen Lösung begünstigt zu sein. Es ist aber auch denkbar, daß das Potential in den $BH^{+}\cdots B$ Brücken in der Schicht durch sterische Effekte so verändert ist, daß sie keinen Beitrag zum Kontinuum mehr liefern. Dafür tritt die Bande bei 2400 cm^{-1} an den Spektren, die von hydratisierten Schichten aufgenommen worden sind, ab ca. 100% Protonierung sehr deutlich hervor.

3.3.3 Magnesiumkomplex des ADP bzw. ATP

3.3.3.1 Bindungskonstante

Das ATP sowohl wie das ADP kann wegen der einsamen Elektronenpaare an den Phosphatketten und am Basenring mit Metallionen Komplexe bilden.

Die Bindungskonstante des Magnesiumkomplexes ist sowohl für das ATP wie auch für das ADP von verschiedenen Autoren mit einer Reihe von Methoden gemessen worden. Philipps (29) gab 1966 einen Ueberblick über die mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse . Die meisten Autoren bedienten sich in den Jahren bis etwa 1960 der pH Titration (33) - (38). Ab 1961 wurden entsprechende Messungen mit Mg^{2+} Indikatoren quantitativ spektrophotometrisch (39),(40) oder fluorometrisch (41) durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte für die Logarithmen der Bindungskonstante:

ADP: log K = 3,0 - 3,5
ATP: log K = 4,0 - 4,5

In einer neueren Arbeit von Heyde und Rimai (42) wird die Konstante für das ATP zu 4,5 ± 0,03 angegeben. Die Komplexbildungskonstante für das protonierte Molekül ist von einigen der genannten Autoren (34) - (36) ebenfalls gemessen worden. Die Werte sind hier:

ADP: log K = 1,5 - 2,0
ATP: log K = 2,0 - 2,5

Zu den Werten des ATP gibt es hier neuere Messungen von Taqui Khan und Martell (43), die von 0,4 - 40°C einen Gang der Konstante von log K = 1,95 - 2,34 festgestellt haben.

3.3.3.2 Mg^{2+} und Proton

In der zitierten Arbeit von Phillips (29) sowie in einer neueren zusammenfassenden Arbeit von Izatt et al. (44) wird auch die Beeinflussung der Protonendissoziationskonstante des endständigen Phosphats durch die Mg^{2+} Komplexbildung behandelt. Hierzu haben ebenfalls einige Autoren Messungen veröffentlicht (z. B.(34), (35) weitere Angaben bei Phillips und Izatt).

Die genaueste Untersuchung dieses Problems dürfte von Rimai und Mitarbeitern stammen (45). Sie zeigen, daß die Komplexbildung mit Mg^{2+} die fragliche Konstante von ca. log K = 6,5 bis 4,5 verschiebt, also eine Aenderung von zwei Größenordnungen auftritt.

Es zeigt sich aus diesen Ergebnissen der folgende wesentliche Befund: Die Komplexbildung und die Protonierung am endständigen Phosphat beeinflussen sich wechselseitig sehr stark. Dies ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

log K (Mg^{2+})		log K (H^+) = $-pK_a$	
ATP	ADP	ATP	ADP
4,5	3,5	6,5	6,5
H^+ ↓		Mg^+ ↓	
2,5	2,0	4,5	5,0

Tab. 8: Gegenseitige Abhängigkeit der Bindung von Mg^{2+} und H^+ am ATP

3.3.3.3 Bindungsort für das Mg^{2+}

Der Ort der Bindung des Mg^{2+} an das ATP ist ebenfalls mit verschiedenen Methoden untersucht worden. Eine Uebersicht geben auch hier Phillips (29) und Izatt et al. (44). Eine

stattliche Zahl von Arbeiten kommt zu dem Ergebnis, daß die Phosphatkette der Nukleotide ganz allgemein der Hauptbindungsort für die Bindung von Metallionen ist (z. B. (34), (35), (36)). Walaas (45) und später Gaucher (46) haben die Bindung von Mg^{2+} und anderen Metallionen an Nukleotide mit verschiedenen Basenresten untersucht. Es ergab sich im Rahmen der Meßgenauigkeit kein Unterschied. Dies schien zu beweisen, daß es keine Bindung der Ionen an die Base gibt.

Andererseits fanden Hotta et al. (37) mit einer UV Messung unter anderem am Adeninring des ATP, daß eine Wechselwirkung bestehen muß, weil die Mg^{2+} Bindung die Abhängigkeit der UV Bande des Adenins vom pH beeinflußt. Dies braucht nicht mit einer Bindung des Mg^{2+} an den Basenrest erklärt werden. Hier kann eine indirekte Einwirkung des Basen-pK_a über die Hydrathülle des am Phosphat gebundenen Mg^{2+} vorliegen.

Phillips diskutiert im einzelnen das Problem und kommt zu dem Schluß, daß der Anteil an "gefalteten" Molekülen mit 1 - 3% abzuschätzen ist.

Im Licht neuerer Ergebnisse und Ueberlegungen muß dieses Ergebnis in Zweifel gezogen werden.

Das Problem ist für die Deutung unserer Messungen, insbesondere für die Diskussion der Veränderungen der H_2O Torsionsschwingungen (Abschnitt 3.4.3.4) von besonderem Interesse. Es sei daher die neue zusammenfassende Darstellung zu diesem Problem von Izatt hier wiedergegeben:

> Phillips (29) summarizes the various types of evidence used to establish the binding sites of Mg^{2+} and Ca^{2+} to the adenine nucleotides and concludes that these ions bind the phosphate but not the ring portion of the nucleotides. Specifically, interaction occurs on the α-phosphate in AMP, α- and ß-phosphates in ADP, and ß- and γ-phosphates in ATP. In an infrared study of freeze-dried samples of Mg^{2+} AMP, Mg^{2+} ADP, Mg^{2+} ATP and Mg^{2+} ITP, interpretation of bond shifts leads to the conclusions that Mg^{2+} bonds to phosphate in all cases and that the purine nucleus is involved in complex formation in ADP and ATP, but not in AMP (31). No information could be obtained concerning the interaction of the C_6O group of the inosine

nucleotides with Mg^{2+} since the C_6O group absorbs in the region of interest. By studying Mg^{2+} interaction with adenosine and pyrophosphate or tripolyphosphate ions present together in equal molar amounts, it was shown that no interaction occurs with adenosine unless it is in the same molecule with the phosphate group. Interpretation of absorption spectra led to the conclusion that Mg^{2+} and Ca^{2+} were interacting simultaneously with ring N atoms and triphosphate O atoms in ATP and other nucleoside triphosphates (37); however, more recent ^{15}N nmr (48), proton nmr (49) temperature jump (50) and Raman (45) data have established that in aqueous solution these ions do not complex with the nitrogen atoms of ATP. The suggestion has been made (51), however, that the small chemical shifts of the ring protons observed (49) in Mg^{2+} ATP complexes reflect the insensitivity of the proton chemical shift to Mg^{2+} binding rather than the absence of Mg^{2+} binding. Site binding to the phosphate moieties of ribonucleotides by Ba^{2+}, Sr^{2+}, Ca^{2+} and Mg^{2+} is indicated by the increased stability of the complex formed by each cation as chain length is increased in the order AMP, ADP, ATP(38) (35)..... $^{2+}$
It is seen that Mg^{2+} has very little effect on the pK value of the base ionization but has a considerable effect on the pK value of the phosphate group, indicating that binding of Mg^{2+} is primarily to the phosphate group. The recent finding (52) using proton nmr and kinetic data that certain transition metal ions coordinate to the N_7 site of ATP via a water bridge structure has prompted the suggestion that Mg^{2+} and/or Ca^{2+} may complex in a similar fashion.

Diese Frage ist also noch nicht endgültig geklärt. Frühere Untersuchungen von Zundel (1) zeigen, daß kein direkter Einfluß von Erdalkaliionen auf Polyelektrolyten auf Polystyrolbasis, die wie das Adenin ein π-Elektronensystem besitzen, nachweisbar ist. Die besprochenen negativen Befunde sind deswegen noch kein Beweis dafür, daß keine Wechselwirkung besteht. Kölkenbeck (30) kommt zu dem Ergebnis, daß beim Poly A eine Struktur vorliegt, in der das Mg^{2+} zwischen Adenin und Phosphat eingebaut ist. In einer neuen theoretischen Arbeit (53) ist gezeigt, daß eine Faltung des ATP energetisch günstig ist. Dabei ist allerdings das isolierte Molekül ohne die umgebende Wasserstruktur gerechnet worden.

Diese neuen Befunde deuten darauf hin, daß die Bindung des Mg^{2+} an die Phosphatkette des ATP wie auch des ADP Ionenbindungscharakter hat und den Hauptanteil der Bindung ausmacht. Zumindest das ATP liegt jedoch wahrscheinlich auch wenigstens zum Teil in einer gefalteten Struktur vor, bei der eine Induktions-Wechselwirkung des Mg^{2+} mit dem π-Elektronensystem des Basenringes besteht.

3.3.3.4 Die Art der Bindung

Brintzinger (32), (54) (55) hat in einer Reihe von IR spektroskopischen Arbeiten eine umfassende Antwort auf die Frage gegeben, wie die Bindung des Mg^{2+} an die Phosphatgruppe von Nukleotiden beschaffen ist. Wie er gezeigt hat, liegen Metallionen im Gleichgewicht sowohl in einer Bindung über ihre Hydrathülle als auch direkt koordinativ gebunden vor. Der Anteil der direkt koordinativ gebundenen Komplexe beträgt beim Mg^{2+} nur etwa 20% (32). Im nächsten Abschnitt, der Messungen am protonierten Mg ADP Komplex behandelt, werden diese Ergebnisse von Brintzinger näher beschrieben und zur Deutung verwendet.

3.3.3.5 Spektren des ADP Komplexes in Abhängigkeit von der Protonierung

Eine Messung der Protonierung des Mg ATP Komplexes konnte nicht vom 0% protonierten und insbesondere nicht vom vollständig unhydrolysierten ATP ausgehend vorgenommen werden, denn es war nicht möglich, den Mg^{2+} Komplex des ATP herzustellen, ohne daß der Hydrolysegrad weniger als 18% betrug. Für ca. 20% hydrolysiertes ATP liefert der Vergleich der Spektren der minimal hydrolysierten ATP Lösung (Abb. 26, 28, 30, jeweils Reihe a) einen Hinweis, wie die Verhältnisse bei der Protonierung der unhydrolysierten Substanz liegen würden.

Wesentlicher für die Beurteilung der Vorgänge bei der Hydrolyse des ATP ist die Messung der Protonierungsabhängigkeit beim Mg^{2+} Komplex des ADP und ein Vergleich mit dem ADP Anion.

Das ADP Anion in der wäßrigen Lösung des Natriumsalzes kann im Vergleich zum Magnesiumkomplex als weitgehend freies Anion betrachtet werden. Dies zeigt ein Vergleich der Bindungskonstanten: log K des Mg^{2+} Komplexes ist mit Werten zwischen 3,0 und 3,5 (vgl. Abschnitt 3.3.3.1) log K des wassergelösten Na^{+} Salzes von Smith und Alberty (56) mit 0,65 angegeben worden.

Folgende Befunde liefert ein Vergleich der Wirkungen der Protonierung auf das IR Spektrum der wäßrigen Lösung des Mg^{2+} Komplexes mit dem des ADP Anions (vgl. Abb. 20 und Abb. 22).

1) Die ν_{as} PO_2^- Schwingung ist beim Mg^{2+} Komplex in ihrer Lage nicht von der Protonierung abhängig. Sie liegt an der Stelle der Schwingung des 50% bzw. 100% protonierten ADP Anions, nämlich bei 1227 cm^{-1} (vgl. Abschn. 3.3.2.3).

2) Die Entartung der ν_{as} $-PO_3^{--}$ Schwingung (1120 cm^{-1}) ist beim Mg^{2+} Komplex vorneherein aufgehoben, d. h. die PO_3^{--} Gruppe ist von vorneherein umgeordnet, wie in Tab. 7 gezeigt.

3) Die ν_{as} $-PO_3^{--}$ Schwingung (1120 cm^{-1}) verschwindet beim ADP Anion bis 100% Protonierung gleichmäßig (vgl. Abb. 20), beim Komplex ist dieser Prozeß bei 50% Protonierung abgeschlossen.

4) Beim Mg^{2+} Komplex ist im Gegensatz zum ADP Anion keine Veränderung der Ringschwingungen mit der Protonierung vorhanden.

Diese Befunde spiegeln zunächst die vielfach gesicherte Tatsache wieder, daß die Anwesenheit eines Mg^{2+} Ions bezüglich der Phosphatgruppe dieselbe Wirkung wie die Protonierung hat. Der Schluß liegt nahe, daß die Mg^{2+} Ionen H_2O Moleküle spalten, die an die Phosphatgruppen gebunden

sind. Die so lokal entstehenden Ueberschußprotonen verursachen dann die beobachteten Effekte.

In der Tat hat Brintzinger eine "lokale Hydrolyse" aus IR Messungen der Wechselwirkung verschiedener zweiwertiger Ionen mit der Phosphatkette des ATP gefolgert (55). Er schließt weiter aus seinen Messungen, daß beim ATP Komplex die drei in Abb. 23 wiedergegebenen Konfigurationen im Gleichgewicht vorhanden sind.

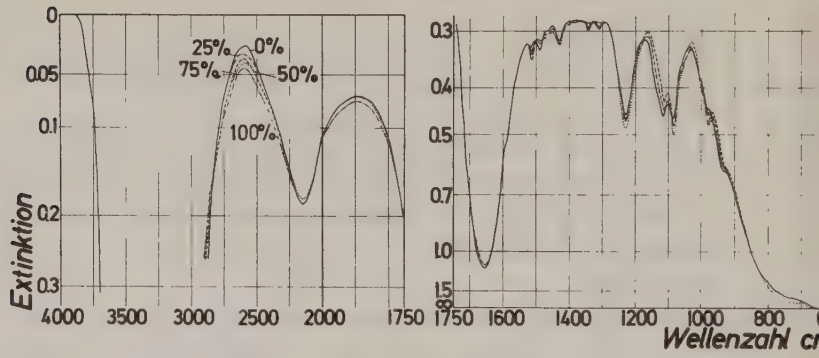


Abb. 22: Spektren der wäßrigen Lösung des schrittweise protonierten Mg ADP Komplexes
Konzentration 170 H_2O/ADP

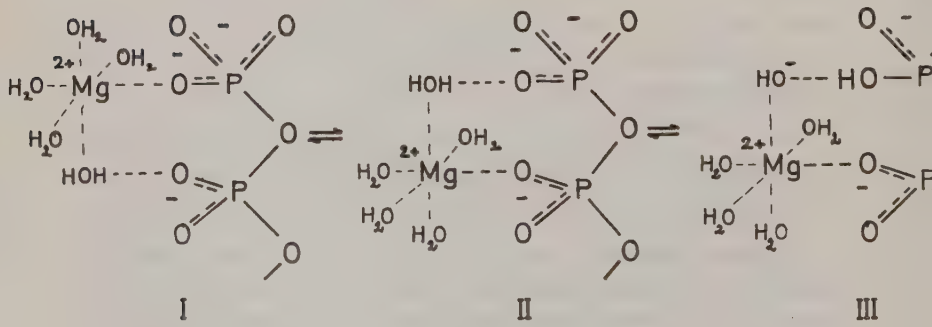


Abb. 23: Die lokale Hydrolyse (nach(55))

Der Anteil der Konfiguration III wird von ihm beim Mg^{2+} ATP mit ca. 50% abgeschätzt. Dieser Befund Brintzingers korrespondiert mit dem unseren, daß beim schrittweisen Ersetzen des K^+ im Mg KADP durch ein Proton nur bis etwa 50% eine Wirkung des Protons auf die PO_3^{2-} Gruppe erkennbar ist.

Das Ergebnis ist so zu deuten, daß das bei der lokalen Hydrolyse entstehende OH^- durch das Angebot an Protonen neutralisiert wird. Das entstehende H_2O erscheint im Spektrum nicht, da H_2O im großen Ueberschuß vorhanden ist. Eine indirekte Wirkung ist eine Verschiebung des Gleichgewichts I-II-III zugunsten der Konfiguration III, bis bei einem Prozentsatz von 50% neu hinzugekommenen Protonen an allen Phosphat-Gruppen jeweils ein Proton anwesend ist. Der Befund 4 korrespondiert zu dem Befund in Tabelle 8, daß die Angleichung der pK_a Werte von endständigem Phosphat und Basenring beim ADP Mg Komplex geringer ist als beim ATP Komplex. Deswegen wird in der ersten Protonierungsstufe nur das Phosphat protoniert, und nicht der Basenrest, wie dies beim ATP teilweise erfolgt (vgl. Abb. 22 und Abb. 28a).

3.3.4 ADP Magnesiumkomplex und PO_4^{3-} Ion

Nachdem in den letzten Abschnitten Einzelsysteme untersucht worden sind, sollen nun Messungen besprochen werden, bei denen Lösungen untersucht wurden, in denen ADP^{3-} und PO_4^{3-} gemeinsam anwesend waren. In Abb. 24 sind die Spektren einer schrittweise protonierten wäßrigen Lösung von ADP^{3-} und PO_4^{3-} wiedergegeben. Das Verhältnis war stets Mg^{2+}:ADP^{3-}: PO_4^{3-} = 1:1:1. Die Konzentration war 170 $H_2O/(PO_4 + ADP)$. Die ionale Zusammensetzung der einzelnen protonierten Substanzen geht aus Abschnitt 2.6.3 hervor. Der Parameter der Untersuchung ist wiederum die Protonierung, sie ist folgendermaßen definiert: K^+ wird schrittweise durch H^+ ersetzt. Von den 6 Ladungen, die an den beiden Anionen PO_4^{3-} und ADP^{3-} zur Verfügung stehen, sind 2 ständig vom Mg^{2+} besetzt. Von den restlichen 4 Ladungen werden in

Stufe 6 der Protonierung 3 durch Protonen eingenommen. Jeder der 6 Protonierungsschritte entspricht also einer halben Ladung, die durch H^+ besetzt wird.

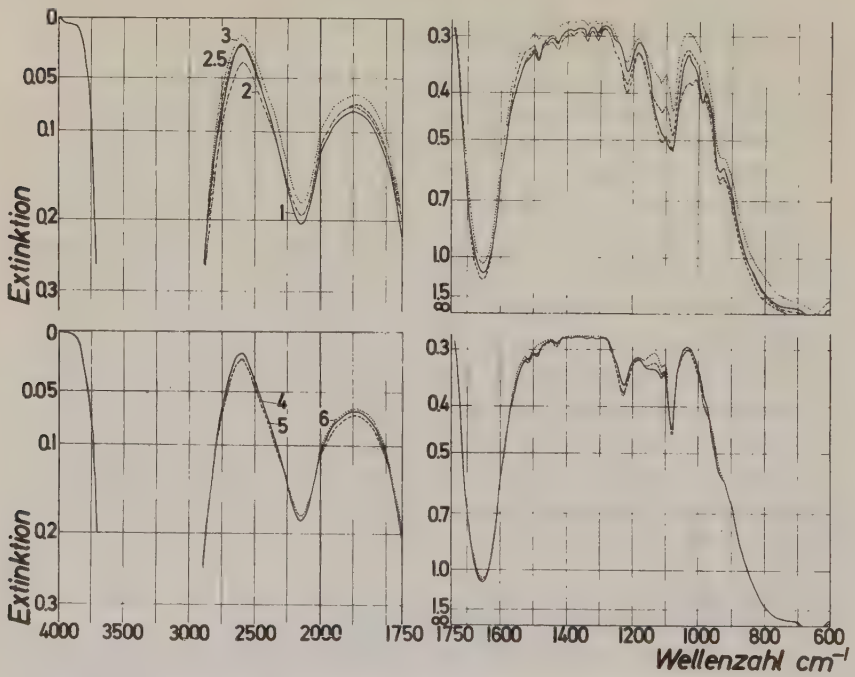


Abb. 24: Spektren der schrittweise protonierten Mischung aus ADP^{3-} und PO_4^{3-}
$ADP^{3-}:PO_4^{3-}:Mg^{2-}$ = 1:1:1 Konzentration 170 H_2O/ADP+PO_4)
In Stufe 6 sind 3 der 6 vorhandenen Ladungen von H^+ besetzt

Man erwartet, daß das PO_4^{3-} Ion wegen seines sehr hohen ersten pK_a Wertes von 12 das erste freiwerdende Proton vollständig binden wird. Zu berücksichtigen ist dabei, daß ja auch die lokale Hydrolyse am Mg ADP Komplex Protonen freisetzt. So erscheinen schon in Stufe 1 (entspricht 50% Pro-

tonierung, bezogen auf beide Anionen) die Banden des 100% protonierten PO_4^{3-} Ions bei 990 und 1080 cm^{-1} (Abb. 17). Das ADP ist noch unprotoniert, wie man an der unveränderten typischen Bande bei 940 cm^{-1} erkennt (vgl. Abb. 22 und 24).

In Stufe 2 verbreitert sich die Absorption im gesamten Bereich von 1250 - 1000 cm^{-1}. Alle Banden werden mit angehoben, die Absorption der PO_3^{2-} Gruppe des ADP bei 1120 cm^{-1} wird sichtbar. Das PO_4^{3-} Ion ist jetzt 150% protoniert, die breite Absorption, die in diesem Protonierungsbereich des PO_4^{3-} auftritt (vgl. Abb. 17), erzeugt das beschriebene Bild.

Beim Uebergang von Stufe 2 nach 3 geht die starke Anhebung des Bereiches 1250 bis 1000 cm^{-1} zurück. Die Absorption bei 1080 cm^{-1} bleibt relativ stark. Dies entspricht dem Uebergang von 150% zum 200% protonierten PO_4^{3-} Ion (vgl. Abb. 17). Auch das ADP ist bereits mit beeinflußt, das läßt sich am Rückgang der Bande bei 940 cm^{-1} beobachten, der die weitere Protonierung des ADP anzeigt (vgl. Abb. 22).

Von Stufe 4 bis 6 wird der ADP Komplex an der PO_3^{2-} Gruppe weiter protoniert. Es zeigen sich die Veränderungen, die in Abb. 22 am Spektrum des Einzelsystems Mg ADP Komplex in wäßriger Lösung studiert werden konnten: Anwachsen der Banden bei 1240, 1180, 980 cm^{-1}, Rückgang der Banden bei 1120 und 940 cm^{-1}.

Das Proton wird dabei zunächst nur wiederum in das Gleichgewicht der lokalen Hydrolyse eingebracht. Es verursacht deswegen wie im Einzelsystem nur geringe Veränderungen. Die vom 200% protonierten PO_4^{3-} Ion herrührenden Absorptionen bleiben unverändert.

Beachtung verdient die recht scharfe und deutliche Abnahme der Absorption des Bereichs der H_2O Torsionsschwingungen ($\leq$ 800 cm^{-1}) in Stufe 3. Dieser Befund wird wesentlich stärker beim hydrolysierenden ATP System wiederkehren.

3.4 Die Hydrolyse des MgATP Komplexes

3.4.1 Die energiereiche Bindung in thermodynamischer und molekularer Betrachtungsweise

George und Rutman (57) betrachteten 1960 erstmals die sogenannte energiereiche Bindung unter thermodynamischen Gesichtspunkten. In dieser Arbeit wird der Unterschied geklärt, der zwischen einer starken und einer energiereichen Bindung besteht. Das energiereiche Molekül erscheint als Träger freier Energie, die gerade unter biologischen Bedingungen bei der Spaltung des Moleküls optimal verfügbar gemacht werden kann. Die Eigenschaften des Moleküls und seine Wechselwirkung mit der Umgebung, insbesondere mit bei der Hydrolyse entstehenden Protonen, ergeben erst zusammen den in der Bioenergetik so zentralen Effekt der energiereichen Bindung. In einer 1970 erschienenen Arbeit (58) hat dann George mit einer Reihe von anderen Mitarbeitern aus thermodynamischen Daten zeigen können, daß der hauptsächliche Anteil der verfügbar werdenden freien Energie der Phosphatester aus der Aenderung der Solvatationsenergie der umgebenden Wasserstruktur bei der Hydrolyse stammt.

In der früheren Arbeit ist insbesondere die gegenseitige Beeinflussung von Dissoziationszustand bzw. Protonierung der Phosphatester und ihrer Hydrolyseenergie beschrieben worden. Die experimentell ermittelten Dissoziationskonstanten liefern einen Ansatz, der die Freisetzung von Protonen während der Hydrolyse mit der Protonierung der bei der Hydrolyse beteiligten Moleküle verknüpft.

Mit den Messungen, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden, wird versucht, die Verbindung von Protonierung, Solvatation und Hydrolyse des ATP im molekularen Maßstab zu beleuchten. Die bisher behandelten Messungen sind die Voraussetzung zur Deutung der im hydrolysierenden System auftretenden Effekte.

3.4.2 Die Hydrolyse des ATP^{4-} Ions in wäßriger Lösung

3.4.2.1 Allgemeines

Die Hydrolyse des ATP vollzieht sich nach folgenden Gleichungen

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + PO_4^{3-} + 2H^+ \quad (1)$$

(Orthophosphathydrolyse des ATP)

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow AMP^{2-} + P_2O_7^{4-} + 2H^+ \quad (2)$$

(Pyrophosphathydrolyse des ATP)

Daneben gibt es die Reaktionen:

$$ADP^{3-} + H_2O \longrightarrow AMP^{2-} + PO_4^{3-} + 2H^+ \quad (3)$$

(Hydrolyse des ADP)

$$P_2O_7^{4-} + H_2O \longrightarrow 2PO_4^{3-} + 2H^+ \quad (4)$$

Es treten also bei der Hydrolyse des ATP^{4-} folgende Ionen auf ATP^{4-}, ADP^{3-}, AMP^{2-}, $P_2O_7^{4-}$, PO_4^{3-}. Mit den in Abschnitt 2.7 geschilderten Methoden konnten die Konzentrationen aller Ionen einzeln verfolgt werden. Dabei mußte immer gelten:

$$(ATP^{4-}) + (ADP^{3-}) + (AMP^{2-}) = (\text{Adenosin}) \quad (5)$$

Die Konzentration auf der linken Seite der Gleichung ergeben sich aus der Bestimmung durch den Boehringer Test (2.7.2.2), die auf der rechten aus der Messung der UV Absorption bei 260 nm (2.7.2.1). Gleichung (5) gilt allerdings nur, solange das AMP Molekül intakt bleibt. Dies war gewährleistet, bis die Lösungen nur noch einen ATP Gehalt von ca. 20% hatten (80% Hydrolyse). Es zeigte sich dann allmählich eine leichte Gelbfärbung der Lösung, eine Erscheinung die wohl auf das Auftreten verharzter Zucker zurückzuführen ist. Die Messungen wurden deswegen nur bis ca. 80%

Hydrolyse durchgeführt. Die UV Bestimmung bei 260 nm wurde nur gelegentlich zur Kontrolle vorgenommen.

Die Hydrolysegrade der Proben der einzelnen Spektren werden durch den Boehringer Test ermittelt. Sie haben folgende Bedeutung:

$$\frac{(ADP) + (AMP)}{(ATP) + (ADP) + (AMP)} \times 100 = \%\text{Hydrolyse} \qquad (6)$$

Die Deutung der Hydrolysespektren wird mit den Messungen am schrittweise protonierten ATP, ADP, PO_4^{3-} und deren Mischungen durchgeführt. Das AMP wurde hier noch nicht mit einbezogen. Es war bei allen Hydrolysegraden:

$$\frac{(AMP)}{(AMP) + (ADP)} \approx 0{,}2 \qquad (7)$$

Bei der Betrachtung der bei der Hydrolyse erhaltenen Spektren zeigt sich, daß an keiner Stelle zusätzliche Banden beobachtet werden, die nicht mit einer Ueberlagerung der von den Einzelsystemen bekannten Effekte zu verstehen wären. Dies beweist freilich nicht, daß nicht insbesondere zur Deutung des H_2O Effekts in Abschnitt 3.4.3.4 das AMP hinzugezogen werden müßte.

Gemäß Gleichung (4) hydrolysiert das nach (2) mitentstandene Pyrophosphat weiter, so daß der stationäre Gehalt an Pyrophosphat in der Meßlösung gering ist. Messungen des Gehalts an Orthophosphat anhand der Phosphatprobe [+]) (vgl. Abschnitt 2.7.4) bestätigen dies.

3.4.2.2 Die bei der Hydrolyse entstehenden Protonen

Wie aus den Reaktionsgleichungen (1) bis (4) hervorgeht, entstehen bei der Hydrolyse eines ATP Moleküls zwei

---

[+]) Die Phosphatprobe liefert exakte Vergleichswerte, doch ist zu bedenken, daß die bei der Probe verwendeten Substanzen die Hydrolyse begünstigen.

Protonen. Diese werden mit den hauptsächlich vorhandenen Ionen ATP^{4-}, ADP^{3-}, PO_4^{3-}, Mg^{2+} und K^+, sowie den aufgrund der Ausgangsprotonierung des hydrolysierenden ATP^{4-} bereits vorhandenen Protonen in Wechselwirkung treten. Im folgenden soll zunächst betrachtet werden, in welchem Ausmaß Protonen mit fortschreitender Hydrolyse wirksam werden können.

Es sei α der Hydrolysegrad, ß die Ausgangsprotonierung. Es gilt $0 \leq \frac{\alpha}{ß} \leq 1$

$P_2O_7^{4-}$ und AMP wird, wie in Abschnitt 3.4.2.1 erläutert, in der hier angewandten Näherung zunächst nicht berücksichtigt.

Dann ist:

$$1 - \alpha = (ATP)$$
$$\alpha = (ADP)$$
$$\alpha = (PO_4)$$
$$ß + 2\alpha = (H^+)$$

Der größte pK_a des PO_4^{3-} Ions ist 12 und liegt damit unter allen vorkommenden Bedingungen um einige Größenordnungen über allen anderen pK_a Werten. Deswegen erscheinen auch im Spektrum nur die Banden für HPO_4^{2-}. Also ist der Anteil der für andere Akzeptoren zur Verfügung stehenden Protonen:

$$H^+ = ß + \alpha$$

3.4.2.3 Die Verteilung der Protonen

Der pK_a Wert ist als Maß für die Protonenaffinität eines Akzeptors zu deuten. Er ist der negative dekadische Logarithmus der Dissoziationskonstante für das Proton an dieser Stelle (vgl. 3.3.2.1). Die Definition bezieht sich auf in reinem Wasser gelöste Substanz. Die übliche physikalisch-chemische Definition bezieht sich auf 1 M Lösung.

Es war sowohl bei der Bildung hydratisierter Schichten (vgl. Abschnitt 3.3.2.4) als auch bei der Komplexbildung (3.3.3) festgestellt worden, daß der pK_a Wert sich infolge Wechselwirkungen mit der Umgebung um Größenordnungen ändern kann. Dann ist zu erwarten - dies wird sich auch aus unseren Messungen ergeben - daß die Affinität eines bestimmten Akzeptors vom Hydrolysegrad abhängen kann.

Dennoch kann man anhand der pK_a Werte von bestimmten Vorstellungen über die zu erwartende Protonierung ausgehen. Deswegen werden im folgenden die pK_a Werte der Magnesiumkomplexe von ATP und ADP, sowie die des PO_4^{3-} Ions einander gegenübergestellt. Vergleiche hierzu auch Abschnitt 3.3.3.2, Tabelle 8.

Neuere Messungen von Rimai und Heyde (59) anhand der Raman-Linien ergeben für die Base und die Phosphatgruppe des ATP

	Anion	Mg Komplex
Basenrest (N_1)	4,15	3,68
Phosphat($-PO_3^{2-}$)	6,50	4,47

Für das ADP folgt aus Messungen durch potentiometrische Titration (60)

	Anion	Mg Komplex
Basenrest (N_1)	4,21	4,16
Phosphat($-PO_3^{2-}$)	5,86	5,19

Für das PO_4^{3-} gibt das Handbook of Chemistry and Physics (61) in Uebereinstimmung mit anderen Tabellen die Werte 12,67, 7,21 und 2,12.

3.4.3 Die Messungen und ihre Deutung

In den Abbildungen 26, 28 und 30 sind die drei gemessenen Bereiche des IR Spektrums gesondert herausgestellt worden. Sie sind folgendermaßen benannt:

I (Abb. 26) Bereich 3000 bis 1800 cm^{-1}
II (Abb. 28) Bereich 1800 bis 1300 cm^{-1}
III (Abb. 30) Bereich 1300 bis 600 cm^{-1}

Untersucht wurde die Hydrolyse von wäßrigen Lösungen von Mg K_2-p_i H_{p_i} ATP.

Die Ausgangsprotonierung betrug $p_1 = 0$
$p_2 = 0,7$
$p_3 = 1,0$

Diesen drei Werten entsprechen die Spalten Nr. 1, 2 und 3. Der Uebersicht halber ist der gesamte Hydrolysebereich in jeweils drei verschiedenen Einzelbildern, a, b und c dargestellt.

Die Abb. 25, 27 und 29 geben die wesentlichen Effekte wieder, die bezüglich der Protonierung aus den Spektren in den Abb. 26, 28 und 30 abgelesen werden können.

Nun sollen anhand der aus dem Hydrolysegrad folgenden Ionenzusammensetzungen und der bekannten Gesamtprotonierung die Wechselwirkungseffekte in den Lösungen bei der Hydrolyse des Magnesium-ATP Komplexes näher betrachtet werden.

3.4.3.1 Phosphatgruppen

Zunächst werde ich Bereich III, den Bereich der Phosphatbanden (Abb. 30) diskutieren. Die Ergebnisse des Abschnittes 3.4.3.1 sind in Abb. 29 schematisch dargestellt.

1. Der Gang mit der Ausgangsprotonierung

Aus den Spektren der Mg KADP Lösung und ihrer Protonierungsstufen (vgl. Abb. 22) wird der Verlauf der Phosphatbanden des ADP bzw. ATP mit der Ausgangsprotonierung verständlich. Während in III 1a die ν_{as} Bande der PO_3^{--} Gruppe (1120 cm^{-1}) noch stark ausgeprägt ist, ist sie in III 3a nahezu völlig verschwunden. Dies war ja bei allen behandelten Spektren ein Maß für die Protonierung der endständigen Phosphatgruppe.

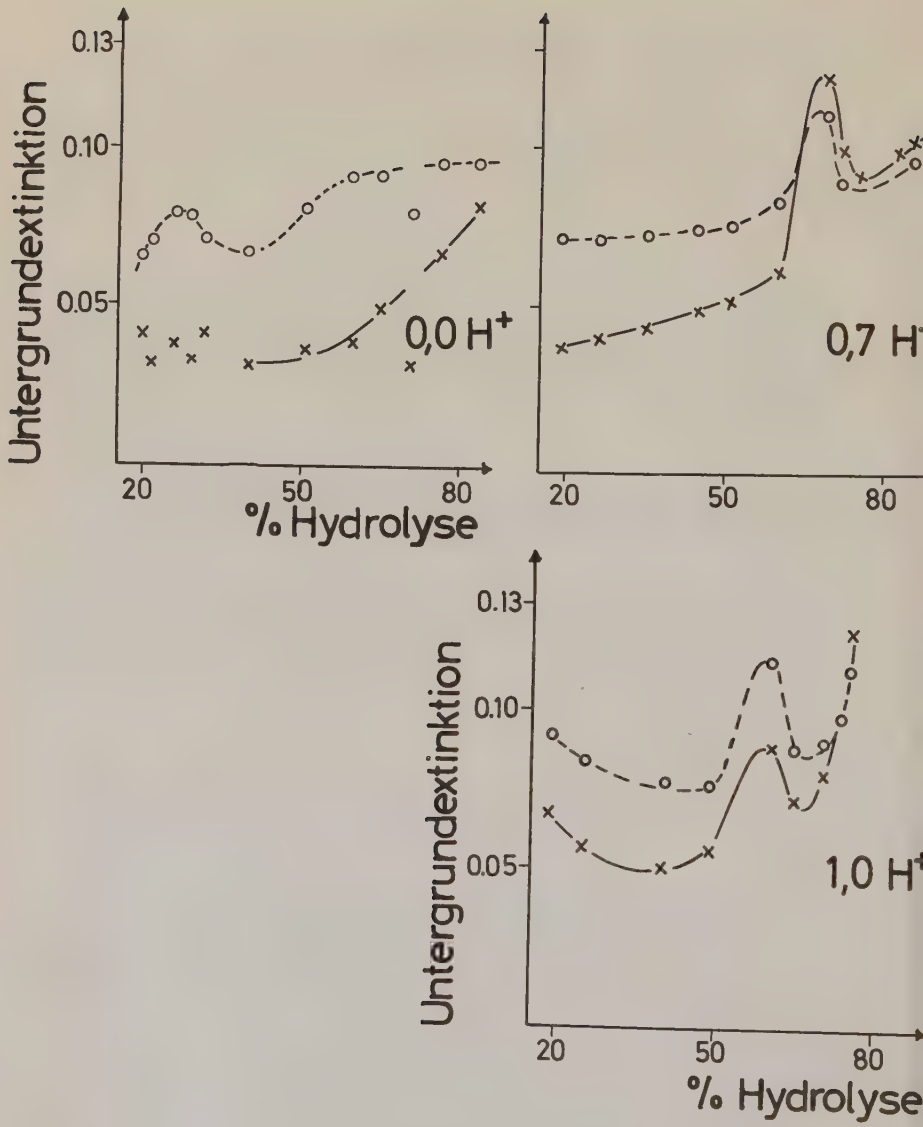


Abb. 25: Der Verlauf der Untergrundextinktion mit der Hydrolyse in den Spektren der Abb. 26 bei zwei verschiedenen Wellenzahlenwerten x 2400 cm^{-1}, O 1900 cm^{-1}

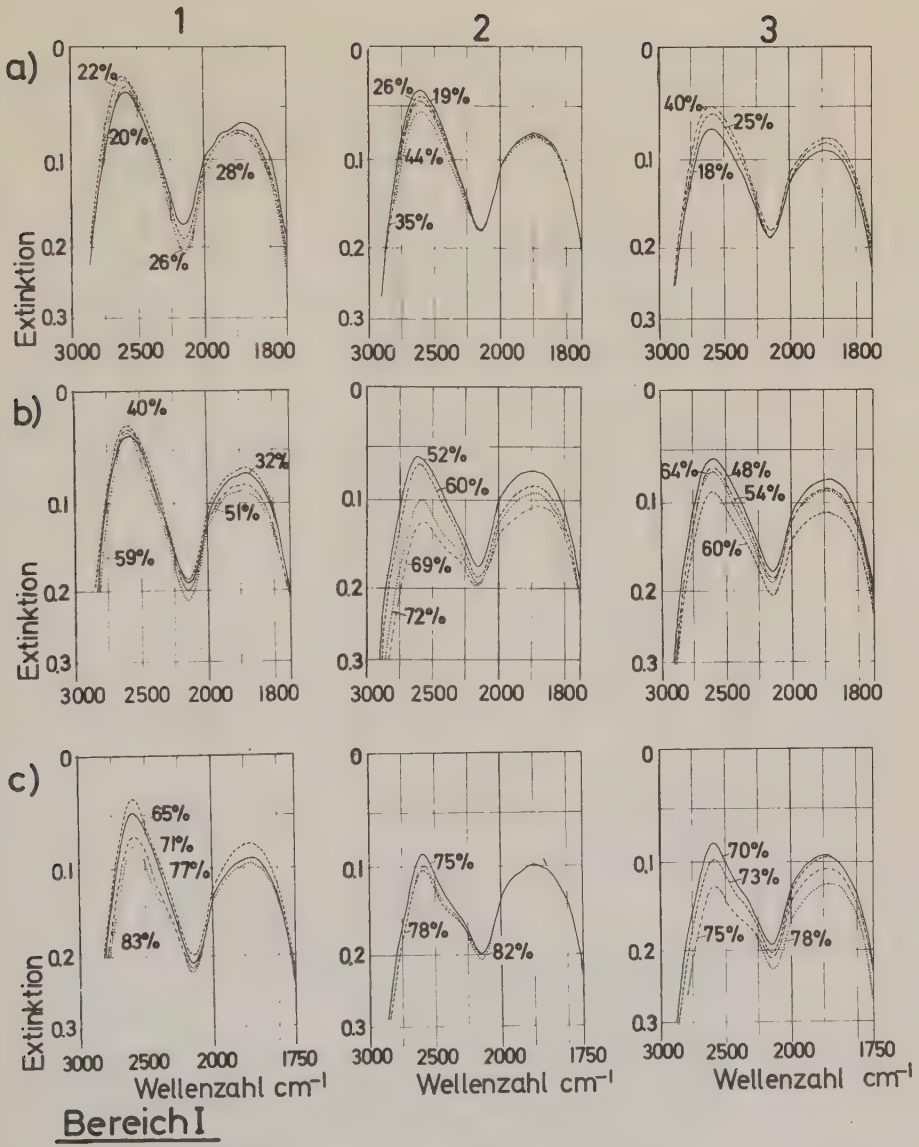


Abb. 26: Spektren der wäßrigen Lösung von hydrolysierendem Mg ATP-Komplex

Ausgangsprotonierung Spalte 1: 0,0 $H^+/2K^+$
Spalte 2: 0,7 $H^+/1,3\ K^+$
Spalte 3: 1 $H^+/1K^+$

Konzentration 170 H_2O/Adenosin

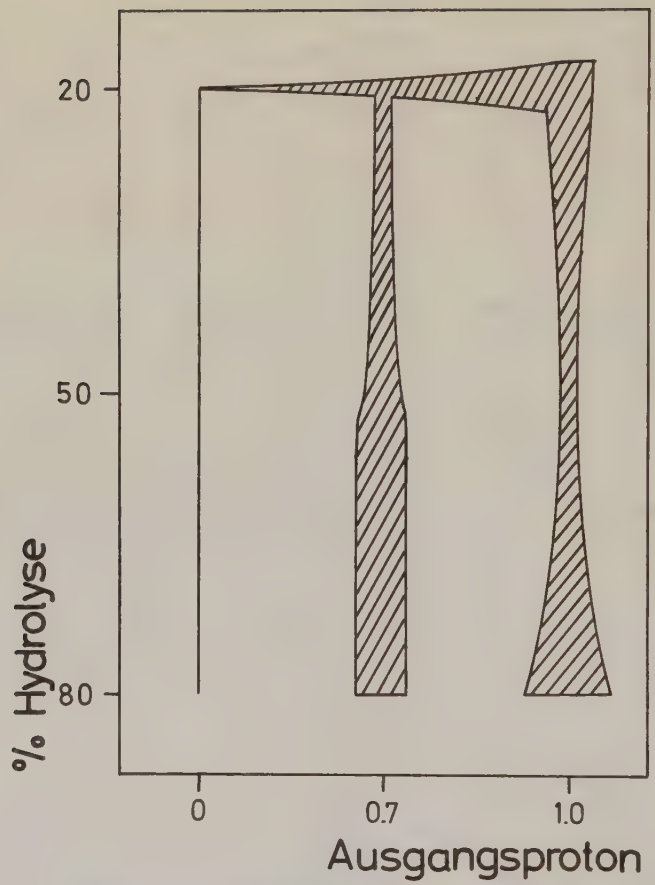
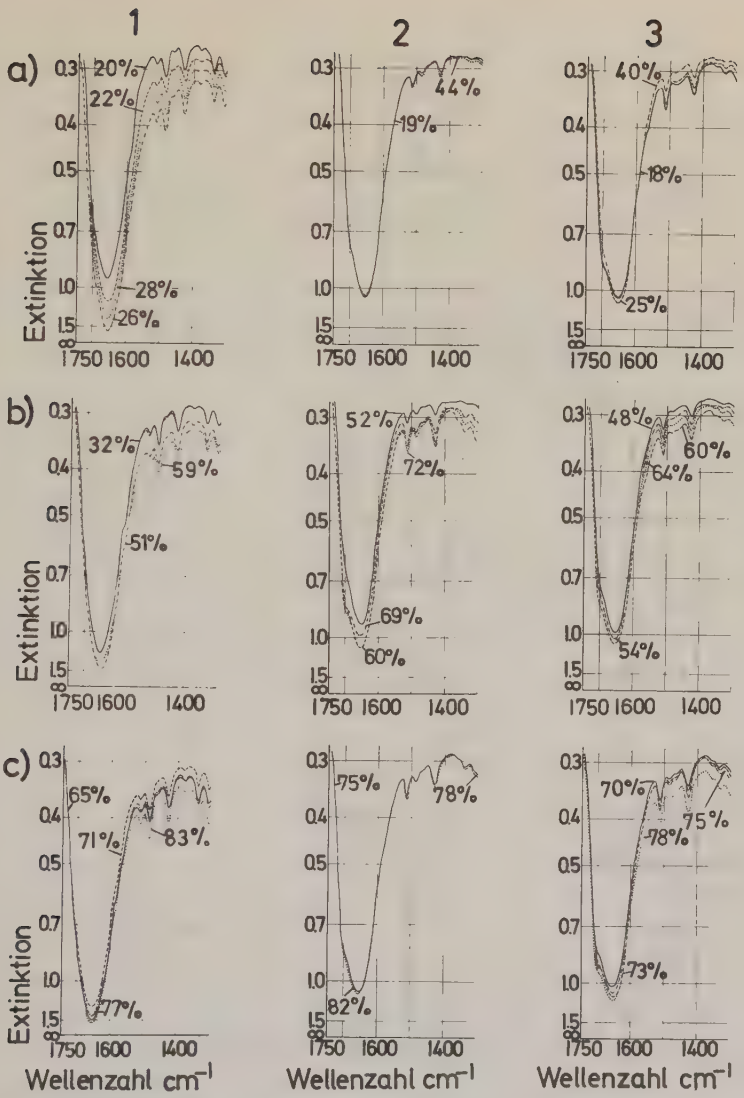


Abb. 27: Schema zur Abhängigkeit der Protonierung des Basenrestes von der gesamten Ausgangsprotonierung und vom Hydrolysegrad, wie sie aus den Spektren in Abb. 28 ersichtlich ist.

Die Breite der von oben nach unten verlaufenden schraffierten Felder zeigt für die drei gemessenen Ausgangsprotonierungen den Gang mit der Hydrolyse. Das von links nach rechts verlaufende Feld veranschaulicht den Gang mit der Ausgangsprotonierung, der für alle Hydrolysegrade abgelesen werden kann.



Bereich II

Abb. 28: Spektren der wäßrigen Lösung von hydrolysierendem Mg ATP-Komplex

Ausgangsprotonierung
Spalte 1: 0,0 $H^+/2K^+$
Spalte 2: 0,7 $H^+/1,3K^+$
Spalte 3: 1 $H^+/1K^+$

Konzentration 170 H_2O/Adenosin

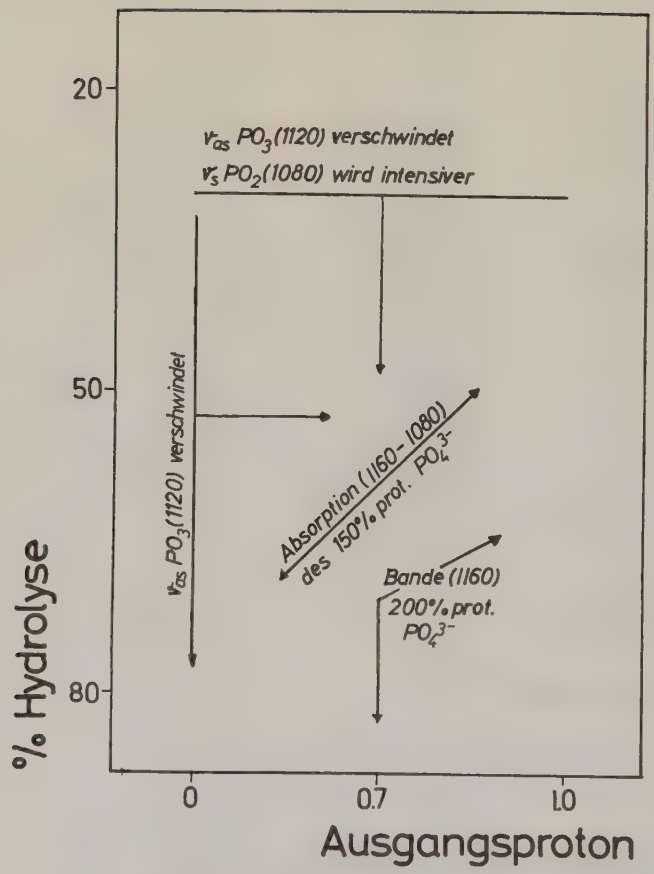


Abb. 29: Schema zur Abhängigkeit der Protonierung der Phosphatgruppen von der gesamten Ausgangsprotonierung und vom Hydrolysegrad, wie sie aus den Spektren in Abb. 30 ersichtlich ist.

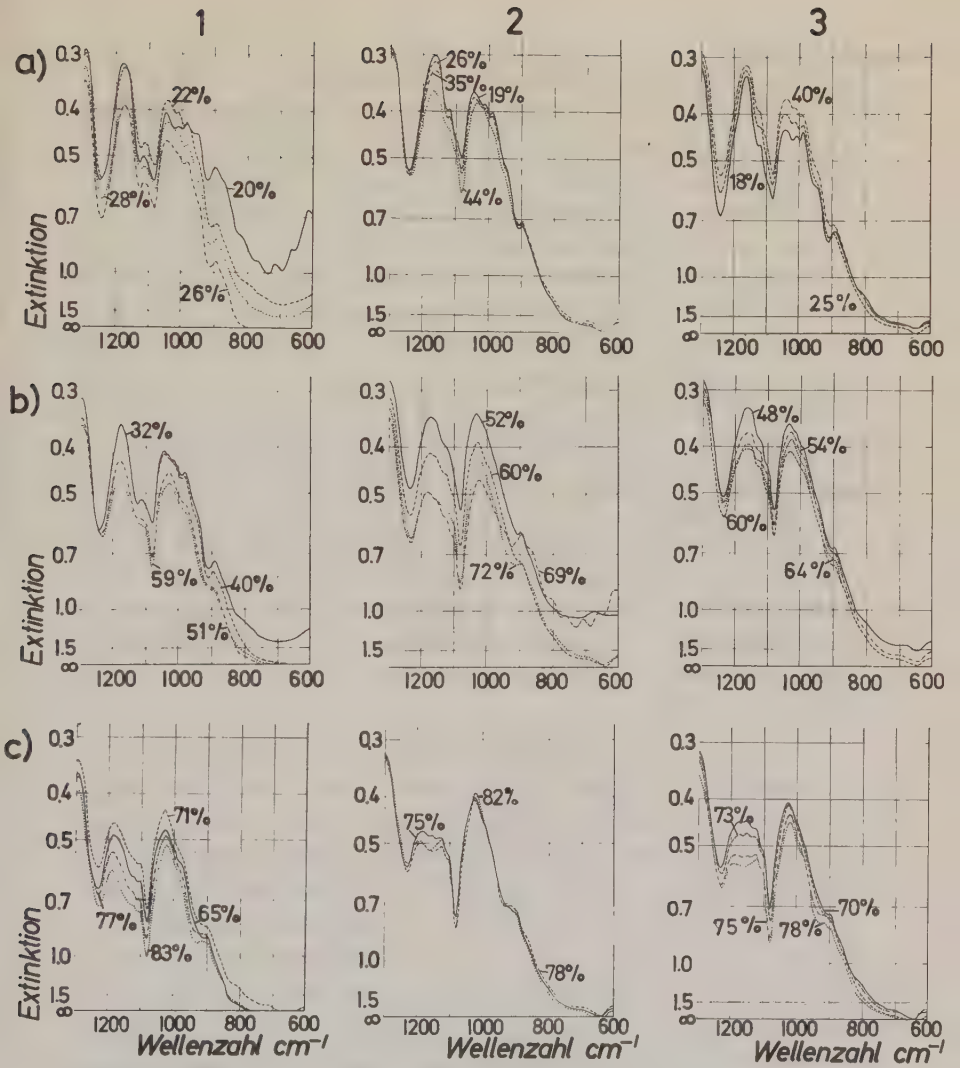


Abb. 30: Spektren der wäßrigen Lösung von hydrolysierendem Mg ATP-Komplex

Ausgangsprotonierung
Spalte 1: 0,0 $H^+/2K^+$
Spalte 2: 0,7 $H^+/1,3K^+$
Spalte 3: 1 $H^+/1K^+$

Konzentration 17O H_2O/Adenosin

2. Die Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

Dieselbe Bande ist in III 1a schon stärker zurückgegangen, als dies für den unprotonierten Mg Komplex des ADP der Fall war (vgl. Abb. 30 mit Abb. 22). Dies entspricht der Tatsache, daß von den beiden bei der Hydrolyse entstehenden Protonen schon bei 20% Hydrolyse einige an die PO_3^{--} Gruppen des ADP bzw. ATP gebunden werden; dies, obwohl man im Hinblick auf die pK_a Werte erwarten würde, daß die entstehenden Phosphationen die Protonen quantitativ abfangen. Diese Abnahme der ν_{as} PO_3^{--} Schwingung (1120 cm^{-1}) mit fortschreitender Hydrolyse ist in allen drei Spezies zu erkennen. Bei allen drei Molekül-Mischungen, die jeweils nach der Hydrolyse der drei ATP Ausgangsmoleküle verbleiben, zeigt sich, daß die Schwingung völlig verschwunden ist. Dabei erscheint in Abb. III 1c im Bereich 1160 - 1080 cm^{-1} die breite Bande des 150% protonierten Phosphations, in den beiden Fällen III 2c und III 3c die des 200% protonierten Phosphations bei 1160 cm^{-1} (vgl. Abb. 17 und Abschnitt 3.3.1.1). Dies entspricht der höheren Ausgangsprotonierung im Fall der Abbildung III 2c und III 3c.

Bei Betrachtung der zugehörigen Hydrolysegrade, die in den Abbildungen jeweils mitangegeben sind, zeigt es sich, daß die Protonierung des Phosphations dem Freiwerden von Protonen während der Hydrolyse und der Ausgangsprotonierung gut zugeordnet ist. Die maximale Absorption des 150% protonierten PO_4^{3-} Ions findet sich in der Hydrolysereihe 1 erst bei ca. 80%, während sie in Reihe 2 bei 70% und in der Reihe 3, weniger ausgeprägt, im Bereich von 60% auftritt.

Die Ausprägung der genannten Absorption ist größer, wenn sie bei höheren Hydrolysegraden auftritt, da der Gehalt der Meßlösung an anorganischem Phosphat mit der Hydrolyse zunimmt.

Betrachten wir nun weiter in Abb. 30 die Banden der PO_2^- Gruppen des ADP bzw. ATP, die in den reinen Lösungen bei 1220 und 1080 cm^{-1} liegen (Abb. 20). Während ν_{as} PO_3^{--}, wie besprochen, mit der Hydrolyse abnimmt, nehmen $_{as}$ PO_2^- (1220 cm^{-1}) und ν_s PO_2^- zu. Dazu kommt die Tendenz, daß die Absorption bei 1080 cm^{-1} gegenüber der bei 1220 cm^{-1} mit wachsender Hydrolyse stärker hervortritt. Es handelt sich um die überlagerte Bande des 100% protonierten Phosphations bei 1080 cm^{-1}, die beim 150% protonierten Ion noch als Schulter vorhanden ist (vgl. Abb. 17).

3. "pK_a Werte" im Hydrolysesystem

Die hier interessierenden pK_a Werte der im Hydrolysesystem vorhandenen Substanzen sind in Abschnitt 3.4.2.3 angegeben worden. Sie sind hier der Größe nach geordnet noch einmal wiedergegeben:

12,0	PO_4^{3-}	4,4	Phosphat	ATP Komplex
7,2	PO_4^{3-}	4,2	Base	ADP Komplex
5,2	Phosphat ADP Komplex	3,7	Base	ATP Komplex

Die Ergebnisse des vorigen Abschnitts zeigen, daß das abgelöste HPO_4^{2-} nicht in der zweiten Stufe voll protoniert wird, bevor sich die endständigen Phosphatgruppen der Adenosinphosphate protonieren (siehe insbes.Abb. III 1c). Dies wäre nach den oben angegebenen pK_a Werten zu erwarten. Es zeigt sich damit, daß die Protonenaffinität des HPO_4^{2-} der der endständigen Phosphatgruppen im Hydrolysesystem stark angenähert ist.

Im folgenden Abschnitt wird sich erweisen, daß auch der Basenrest der Adenosinphosphate parallel protoniert wird. Daraus folgt, daß die Annäherung auf eine Absenkung der Protonenaffinität des HPO_4^{2-} zurückzuführen ist.

3.4.3.2 Die Protonierung der Basenreste

Abb. 28 (Bereich II) zeigt die Veränderungen der Spektren im Bereich der Ringschwingungen. Die Protonierung der Basenreste zeigt sich, wie auch bei den freien Ade-

nosinphosphaten (vgl. Abschnitt 3.3.2) an der Schwingung des am N_1 protonierten Basenrings bei 1690 cm^{-1}. Wie schon in Abschnitt 3.3.2.2 erwähnt, ist die Abnahme der Bande bei 1480 cm^{-1} und die gleichzeitige Zunahme der Bande bei 1520 cm^{-1} ein weiteres Kriterium für die Protonierung des Basenrests.

1. Gang mit der Ausgangsprotonierung

Mit wachsender Protonierung nimmt auch die Protonierung des Rings zu. Diese Tendenz ist in der Abb.28 (II)von Spalte 1 nach 3 schön zu verfolgen.

2. Abhängigkeit vom Hydrolysegrad

Der Verlauf der Protonierung des Rings mit der Hydrolyse und seine Beziehung zum Verlauf der Protonierung der endständigen Phosphatgruppen ist für die Reihen II 1a-c und II 2a-c leicht zu überschauen:

Bei der Reihe 1 wird wegen der fehlenden Ausgangsprotonierung während der Hydrolyse nie eine genügend hohe Gesamtprotonierung erreicht, um den N_1 Akzeptor noch merklich mit einzubeziehen.

In den Reihen II 2a-c wird zunächst folgendes deutlich: Ein Teil der bei der Hydrolyse entstehenden Protonen wird zunächst auf den Ring übertragen. Das geschieht in zunehmendem Maße, bis ab ca. 50-60% Hydrolyse das Phosphation (vgl. Abb. III 2b-c) von 150-200% weiter protoniert wird (vgl. Abschnitt 3.3.1). Die Ringprotonierung nimmt von da an nicht mehr weiter zu.

In der Hydrolyse-Reihe II 3a-c ist eine Protonierung des N_1 bei der 100% protonierten Ausgangssubstanz bereits deutlich vorhanden. Die Abnahme dieser Protonierung mit der Hydrolyse erklärt sich durch die Wirkung der endständigen Phosphatgruppe des bei der Hydrolyse entstehenden ADP (siehe nächsten Abschnitt). Bei höheren Hydrolysegraden nimmt die Ringprotonierung wieder zu.

3. Der Zusammenhang mit der Protonierung der Phosphatgruppen

Zur Erklärung des Verlaufs der Ringprotonierung in Reihe 2 und 3 sind die Vorgänge an den Phosphatgruppen mit heranzuziehen (vgl. dazu im folgenden die Bereiche II und III, Abb. 28 und 30).

Zur Erklärung des Verlaufs in Spalte 2:

Bis 50% Hydrolyse werden an das abgelöste Phosphation mehr Protonen gebunden, als jeweils bei der Hydrolyse ohnehin am Phosphat (pK = 12) verbleiben, m.a.W.,das Phosphation wird über 100% protoniert. Das ist in Abschnitt 3.4.3.1 gezeigt. Parallel dazu lagern sich jedoch auch Protonen am Basenrest an. Im Bereich von 60 - 70% Hydrolyse ist dieser Prozess begünstigt. Das ist wie folgt begründet: Bei der Besprechung des Verlaufs der Kontinuumsabsorption im nächsten Abschnitt wird diskutiert, daß sich bei 150% Protonierung des Phosphations (entspricht 70% Hydrolyse) $OH^+ \cdots O$ Brücken bilden. Diese Brücken sind stabilisiert und behindern deshalb zunächst die Weiterprotonierung des Phosphations. Dies ist der Grund für die Bevorzugung der Ringprotonierung in diesem Bereich. Wie aus der Betrachtung im nächsten Abschnitt 3.4.3.3 hervorgeht, werden die Brücken zwischen den Phosphationen aufgebrochen, wenn die Hydrolyse 70% übersteigt. Damit wird die Base nicht mehr bevorzugt und das PO_4^- Ion wird weiter protoniert (siehe auch Abschnitt 3.3.1.2).

Der Verlauf in Spalte 3:

Das 18% hydrolysierte Mg KHATP zeigt bereits eine Ringprotonierung. Mit zunehmender Hydrolyse entziehen die entstehenden phosphorsauren Gruppen den Basenresten einen Teil der ursprünglich gebundenen Protonen.

Abschnitt 3.4.3.1 zeigte, daß um 70% Hydrolyse der zweite Protonierungsschritt des PO_4^{3-} Ions abgeschlossen ist. Deshalb wird nun bevorzugt der Basenrest [+]) protoniert.

[+]) insbesondere des ADP, dessen Banden ja bei diesem Hydrolysegrad stark überwiegen

Im Vergleich zu Spalte 2 sind hier ja mehr Protonen vorhanden, weshalb dies schon bei 70% einsetzt.

3.4.3.3 Die Kontinuumsabsorption

Anhand des Verlaufs der Kontinuumsabsorption mit der Hydrolyse lassen sich mit den bisher entwickelten Vorstellungen über die ionale Zusammensetzung und die zugehörige Protonierung bei einem gewissen Hydrolysegrad weitere Aussagen gewinnen. Diese können einerseits die bestehenden Vorstellungen bestätigen, vor allem aber lassen sich so einige wichtige Eigenschaften der während der Hydrolyse auftretenden zwischenmolekularen Wechselwirkungen angeben. Denn das Auftreten der Kontinuumsabsorption zeigt die Anwesenheit extrem leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken und alle damit verbundenen Wechselwirkungseffekte an (siehe Abschnitt 3.1).

Die Untergrundextinktion in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad ist in Abb. 25 für zwei verschiedene Wellenzahlwerte aufgetragen. Die Wellenzahlen werden so gewählt, daß Banden die Aenderung der Extinktion möglichst wenig beeinflussen. Abb. 26 zeigt den entsprechenden Spektralbereich, in dem sich die Kontinuumsabsorption deutlich erkennen läßt. Die Kurve für den Verlauf des Kontinuums kann als Superposition zweier Kurven verstanden werden, die den beiden wesentlichsten, kontinuumserzeugenden Prozessen entsprechen. Die in Abschnitt 3.3.3.5 behandelte lokale Hydrolyse spielt hier keine Rolle mehr, da diese durch die auch bei den kleinsten Hydrolysegraden bereits vorhandenen Protonen zurückgedrängt worden ist. (Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten der Konfiguration III in Abb. 23).

1. Kontinuum durch $POH^{+}\cdots O$ Brücken zwischen Phosphationen

Das Maximum der Kontinuumsabsorption wird Wasserstoff-Brücken in Gruppierungen zugeordnet, die die folgenden beiden Grenzstrukturen darstellen:

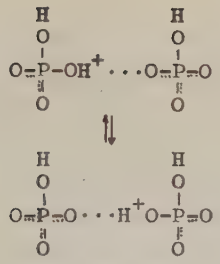


Abb. 31: HPO_4^{2-} Struktur im hydrolysierenden ATP System

Dies wird durch folgende Befunde begründet:

1. An den Stellen des bezeichneten Maximums ist das Phosphation 150% protoniert (Abschnitt 3.4.3.1)

2. Das Phosphation zeigt, bei 150% Protonierung isoliert in wäßriger Lösung untersucht, ebenfalls ein Maximum der Kontinuumsabsorption (Abschnitt 3.3.1.2)

3. Bei den Brücken in den postulierten Gruppierungen handelt es sich um Brücken vom Typ $BH^+\cdots B$. Nach (5) verursachen derartige Brücken in wäßrigem Milieu ein Kontinuum, wenn der pK_a der Akzeptorgruppe 8 ist. Diese Bedingung ist erfüllt.

4. An der jeweiligen Stelle ist nach Lage und Intensität der Banden kein von einer $BH^+\cdots B$ Wasserstoff-Brücke herrührendes Maximum zu erwarten. Der Basenring zeigt bei dem betreffenden Hydrolysegrad konstante Protonierung, ebenso ist keine starke Veränderung der Protonierung der PO_2^- oder PO_3^{--} Gruppen des ATP oder ADP zu beobachten (Abb. 28 und 30).

Die Lage des diskutierten Maximums der Kontinuumsabsorption verschiebt sich - wie zu erwarten war - mit abnehmender Ausgangsprotonierung nach größeren Hydrolysegraden.

Im System mit 0% Ausgangsprotonierung ist dieses Maximum bei so großen Hydrolysegraden zu erwarten, daß der Anstieg, der im System mit 0% Ausgangsprotonierung um etwa 50% Hydrolyse beginnt, seiner linken Flanke entsprechen könnte +).

+) Leider konnten die Kurven nicht bis zu noch größeren Hydrolysegraden verfolgt werden (siehe dazu Abschn. 3.4.2.1)

Sicher ist, daß der Anstieg nicht mit einer Ringprotonierung zusammenhängt. Nach Abschnitt 3.4.3.2 (Abb. 28) ist in diesem Fall keine Protonierung der Base vorhanden. Die Tatsache, daß er bei den beiden verschiedenen Wellenzahlwerten in verschiedener Weise mit der Hydrolyse und damit der Protonierung verläuft, legt den Schluß nahe, daß dieses Kontinuum bevorzugt durch $B_1H^+ \cdots B_2$ Wasserstoff-Brücken mit Doppelminimum verursacht wird (siehe Abschnitt 3.1.2). In Frage kommen dafür vor allem Brücken zwischen dem Phosphation und der PO_3^{2-} Gruppe des ADP.

Die bei Hydrolysegraden unter 40% in diesem System auftretenden Effekte können wir noch nicht verstehen. Wir werden in Abschnitt 3.4.3.4 sehen, daß in diesem Bereich andere starke Effekte überlagert sind.

2. Kontinuum durch $NH^+ \cdots N$ Brücken zwischen den Baseresten

Aus Abb. 26 Bereich I ist ersichtlich, daß nur in den Systemen mit 0,7 und 1,0 Ausgangsprotonierung (Spalte 2 und 3) ein Kontinuumseffekt auftritt, der sich über den gesamten Bereich der Hydrolyse erstreckt. Im System 2 handelt es sich um einen relativ gleichmäßigen Anstieg über den ganzen Hydrolysebereich, im System 3 um eine Abnahme der Kontinuumsabsorption und einen darauffolgenden Anstieg, der bei Hydrolysegraden über 70% recht steil wird.

Dieses Kontinuum ist im wesentlichen durch $NH^+ \cdots N$ Brücken zwischen den Baseresten verursacht, denn der Verlauf der Extinktion dieser Kontinuumsabsorption und der Verlauf der Ringprotonierung sind in allen Bereichen parallel.

$NH^+ \cdots N$ Brücken dieser Art können, wie aus der Literatur bekannt ist (5) (7) (8), Potentiale der in 3.1 besprochenen Art besitzen und sind dann leicht polarisierbar. Daß dies im Fall des Purins in wäßriger Lösung zutrifft, hat Sessler (5) (6) gezeigt.

Die Basenringe, zwischen denen sich die polarisierbaren $NH^+\cdots N$ Brücken ausbilden, gehören entweder dem ATP oder dem ADP an. Die Zuordnung des steilen Anstiegs der Extinktion des Kontinuums in Abb. I 3c zu Baseresten des ATP ist nicht möglich, da die ATP Konzentration in diesem Bereich bereits klein ist und mit dem Anstieg des Kontinuums abnimmt.

Es war schon in Abschnitt 3.4.3.2 festgestellt worden, daß sich der Mg ADP Komplex im Hydrolysesystem an der Base protoniert, entgegen dem Befund in reiner wäßriger Lösung. Es handelt sich also in diesem Bereich bevorzugt um $NH^+\cdots N$ Brücken zwischen ADP Molekülen. Zweifelhaft bleibt dabei im Fall des Systems in I 3c, ob der steile Anstieg der Extinktion des Kontinuums allein durch $NH^+\cdots N$ Brücken verursacht ist.

Es liegt nahe, daß auch polarisierbare $OH^+\cdots O$ Brücken zwischen den Phosphatketten von insbesondere ADP Molekülen ein Kontinuum verursachen, obwohl dies der Erfahrung im reinen Mg ADP System in wäßriger Lösung widerspricht (3.3.3.5). Das dort auftretende Kontinuum war nur sehr schwach. Man muß aber bedenken, daß die Hydrolyse des ATP in I 3c schon sehr weit fortgeschritten ist. Das führt zu wesentlich komplizierteren Verhältnissen.

3.4.3.4 Veränderungen an den Banden des H_2O

Schon bei früheren Messungen in unserem Arbeitskreis hat sich gezeigt, daß die Torsionsschwingung des H_2O durch die Ausbildung polarisierbarer Wasserstoff-Brücken und das damit verbundene Kontinuum im IR Spektrum beeinflußt wird, da die Uebergänge in den polarisierbaren H^+ Brücken mit den zwischenmolekularen Schwingungen koppeln.

Auch bei der Untersuchung des PO_4^{3-} Systems (Abschnitt 3.3.1) und des (PO_4^{3-} + Mg KADP) Systems (Abschnitt 3.3.4)

zeigte sich dieser Effekt in einer Abnahme der Intensität der Torsionsschwingung, wenn eine Kontinuumsabsorption auftrat.

Ein Vergleich der beiden Abbildungen I 2b und III 2b zeigt, daß im Fall des 70% hydrolysierten Mg ATP Komplexes mit 0,7 Ausgangsprotonierung die Abnahme der Intensität der H_2O Torsionsschwingung und die Zunahme in der Intensität der Kontinuumsabsorption parallel erfolgen. In diesem Fall erklärt sich die Beobachtung in der diskutierten Weise.

Im ATP Hydrolysesystem tritt die Veränderung der Intensität der Torsionsschwingung auch sonst häufig auf (Abb. 30), ohne daß eine Korrelation mit dem Verlauf der Untergrundabsorption besteht.

Die molekulare Ursache dieser Effekte konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Im folgenden sind die experimentellen Beobachtungen zusammengestellt. Einige Betrachtungen bezüglich der Hydratstrukturänderung schließen sich an.

Die Absorption der H_2O Torsionsschwingung ist für den extremen Fall, der im Anfangsbereich der Hydrolyse bei Ausgangprotonierung 0 auftritt (Abb. III 1a) in Abb. 32 noch einmal deutlicher dargestellt. Die Spektren geben die Absorption von H_2O wieder, in dem MgK_2ATP von Hydrolysegraden zwischen 20 und 26% gelöst ist. Zum Vergleich ist die Absorption des reinen Wassers dargestellt, wie sie bei derselben Schichtdicke auftritt.

Sehr grob abgeschätzt, steigt die Extinktion der H_2O Torsionsschwingung in diesem Bereich insgesamt um den Faktor 100, wobei die Extinktion, die 20% Hydrolyse entspricht, um den Faktor 50 unter der des reinen Wassers, die 26% entsprechende um ebensoviel darüberliegt. Dieses Beispiel soll veranschaulichen, wie enorm stark der Effekt auftreten kann. Im Zusammenhang mit dem Einfluß der Wasserschwingungen ergeben sich folgende Befunde:

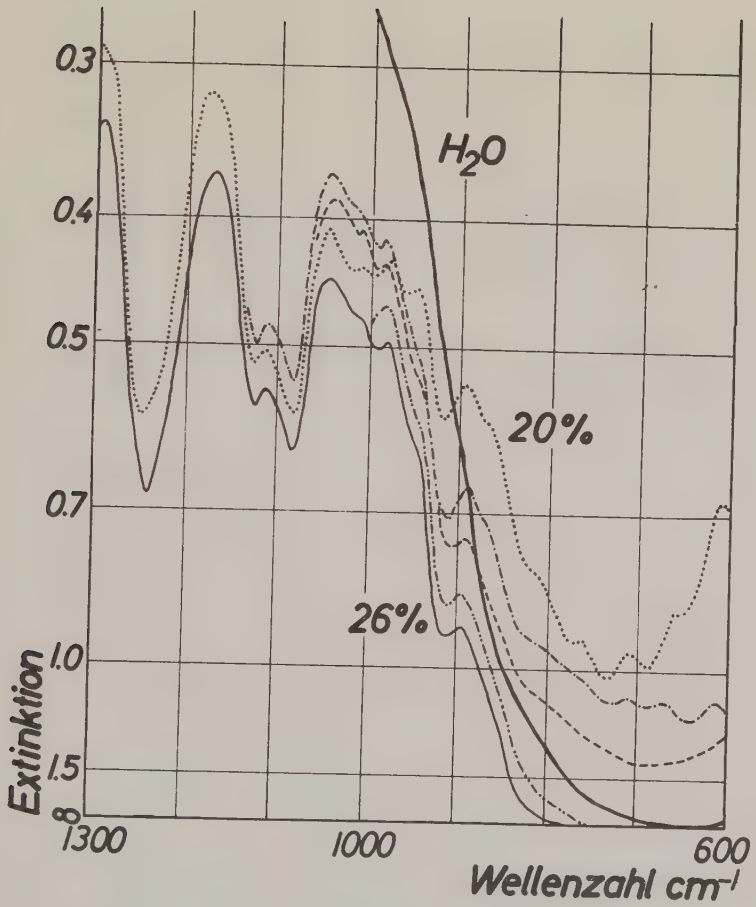


Abb. 32: Die Torsionsschwingungen des H_2O im Bereich 600 cm^{-1} für verschiedene Hydrolysegrade des MgK_2ATP

1. Die Extinktion der Scherenschwingung (1640 cm^{-1}) und die der Torsionsschwingung (um 700 cm^{-1}) nehmen gemeinsam zu oder ab, wenn sich die Abnahme der Torsionsschwingung nicht durch die Kopplung mit den polarisierbaren H^+ Brücken erklärt.

2. Es treten im Bereich 750 - 600 cm^{-1} zwei verschiedene Banden auf, die einander ausschließen. Für kleine Absorptionen zeigt sich eine sehr breite Bande mit einem Maximum bei 710 cm^{-1}, für höhere Absorptionen liegt das Maximum, soweit dies noch erkennbar ist, bei 650 cm^{-1}.

3. Wenn die Intensität der Torsionsschwingung minimal wird, bekommt sie eine regelmäßige Struktur (vgl. Abb. III 1a und III 2b). Diese Struktur verschwindet, sobald die Absorption zunimmt.

4. Die Bande bei 2170 cm^{-1} verschiebt sich, wenn die Torsionsschwingung minimale Intensität hat, in einem sehr engen Hydrolysebereich nach höheren Wellenzahlen.

Fox und Martin (62) stellten bereits 1940 fest, daß sich die Bande des H_2O bei 2170 cm^{-1} nach höheren Wellenzahlen verschiebt, wenn die Temperatur der Probelösung verringert wird. Temperaturerniedrigung ist mit einer "Versteifung" der Wasserstruktur verbunden. Folglich ist nach Befund 4 bei unserem Wassereffekt eine Verhärtung der Struktur mit Abnahme der Torsionsschwingung anzunehmen. Sie erfolgt jedoch nicht allmählich, sondern in einem so engen Hydrolysebereich, daß man eher an einen scharfen Uebergang in eine andere, "steifere" Struktur denken kann.

Die beiden Banden im Bereich 750 - 600 cm^{-1} (Befund 2) sind in diesem Zusammenhang zwei möglichen Strukturen der wäßrigen Lösung zuzuordnen, bei denen die Torsionsschwingung des H_2O Uebergangsmomente verschiedener Größe besitzt. Wenn die Bande bei höheren Wellenzahlen liegt, so zeigt dies ebenfalls an, daß eine Versteifung der Hydratstruktur in der Lösung eingetreten ist.

Die Bande der Torsionsschwingung des reinen Wassers ist von Giguere und Harvey (63) bei 710 cm^{-1} mit einer Genauigkeit von ± 10 cm^{-1} lokalisiert worden. Dies für eine Temperatur von 10° C. Der anormale Fall, in dem die H_2O Bande der ATP Lösung verschoben und geschwächt ist, entspricht also dem Fall des reinen Wassers.

Die nach Befund 3 vorhandene Struktur der höherfrequenten Bande kann demnach so gedeutet werden, daß sich bei der Konfiguration von ATP Molekülen und Hydrolyseprodukten, die in einem äußerst engen Hydrolysebereich der Lösung vorliegt, die Hydratstruktur stabilisiert.

Hier zeigen sich Parallelen zu der Vermutung von George et al. (58), daß für die Aenderung der freien Energie bei der ATP Hydrolyse hauptsächlich Aenderungen der Solvationsenergien von Bedeutung sind.

Um diese Befunde weiter zu klären, müssen weitere IR Untersuchungen und insbesondere auch Untersuchungen bis in den Bereich kleinerer Wellenzahlen vorgenommen werden. Young und Jones haben eine für diese Messungen geeignete Küvette beschrieben (64).

Ferner ergeben sich Möglichkeiten der Deutung über eine Messung der Dielektrizitätskonstante in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad. Sachs, Raziel, Eisenberg und Katchalsky (65) bestimmten die dielektrische Dispersion von Polyelektrolytlösungen in Wasser zwischen 0,6 und 30 MHz und konnten so Rückschlüsse auf die Relaxation der Ionenatmosphäre ziehen, die das Makro-Ion umgibt.

Experimentelle Möglichkeiten zur Bestimmung der DK des Wassers geben auch Vidulich et al. (66), sowie Katz et al. (67) an.

In diesem Jahr ist bei Ultra-Schall Relaxationsmessungen am ATP in wäßriger Lösung ein Effekt aufgetreten, der mit den hier geschilderten in enger Verbindung stehen dürfte (68).

Neben diesen experimentellen sind auch theoretische Wege möglich, um die beobachteten Effekte molekularen Vorstellungen zuzuordnen. In diesem Jahr sind zwei Arbeiten von Curnutte und Bandekar erschienen (69) (70). In der ersten wird mittels einer Normalkoordinatenrechnung die Frequenzverteilung der intermolekularen Verdichtungen des Wassers berechnet. In der zweiten Arbeit verwerten die Autoren neue experimentelle Daten, vor allem Messungen im fernen IR (71) (72), um die intermolekularen Schwingungen der H_2O Moleküle in Normalkoordinaten zu beschreiben. Dabei wird angenommen, daß das starre Wassermolekül über H^+ Brücken an seine vier nächsten Nachbarn gebunden ist. Für dieses Modell hat die Potentialfunktion vier freie Parameter. Drei davon geben die Wechselwirkung über die Wasserstoff-Brücken wieder, der vierte Parameter beschreibt die Wechselwirkung des elektrischen Dipols des Wassermoleküls mit dem lokalen elektrischen Feld. Hier erscheint mir auch ein Ansatzpunkt zur Analyse unseres Problems, denn das lokale elektrische Feld wird durch benachbarte Ionen stark mitbestimmt.

4. Biologische Aspekte

In der vorgelegten Arbeit ist darauf hingewiesen worden, daß das ATP System für uns vor allem wegen seiner großen biologischen Bedeutung von Interesse war. Mit den beschriebenen Meßergebnissen lassen sich noch keine konkreten biologischen Aussagen machen. Die vorliegenden Ergebnisse sind nur als einer von vielen Schritten in Richtung auf ein Verständnis der molekularen Mechanismen in der Bioenergetik zu werten.

Es zeigt sich jedoch, daß an hydrolysierenden, wäßrigen ATP Lösungen bereits recht ungewöhnliche Eigenschaften studiert werden können:

Bei der Hydrolyse des ATP werden Wasserstoff-Brücken gebildet, zwischen denen weitreichende Kräfte wirken (ca. 400 Å) und die Hydratstruktur ändert sich in eklatanter Weise. Es ist anzunehmen, daß die Natur in der Evolution von diesen Eigenschaften des ATP Systems Gebrauch gemacht hat.

Hydrolysierendes ATP ist in vielen biologischen Systemen anwesend, so z. B. an den Muskelproteinen. Um den biologischen Fragestellungen näherzukommen, habe ich ein funktionsfähiges Präparat von Actomyosin hergestellt. Ferner habe ich zwei Küvetten gebaut, mit denen eine vergleichende IR Untersuchung des Präparats in den drei Zuständen Erschlaffung, Kontraktion und Totenstarre durchgeführt werden soll. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Zusammenfassung

1. Der Mg ATP Komplex ist das Substrat enzymatischer Prozesse in der lebenden Zelle, bei denen durch die Bildung bzw. Lösung der sogenannten "Energiereichen Bindung" freie Energie gespeichert oder zur Verfügung gestellt wird. Beide Energieübertragungen werden in vivo durch sehr komplizierte Prozesse bewerkstelligt.

Es war gleichwohl zu erwarten, daß die Untersuchung der zwischenmolekularen Wechselwirkung bei der spontanen Hydrolyse des ATP in wäßriger Lösung bereits Ergebnisse liefern würde, die zur exakten Analyse der Vorgänge in eigentlichen biologischen Systemen beitragen können.

2. Frühere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis ließen erwarten, daß eine derartige Information mit Hilfe der IR Spektroskopie zu gewinnen sein würde. Dazu waren einige experimentelle Verbesserungen nötig. Eine Flüssigkeitsküvette wird beschrieben, die die Aufnahme reproduzierbarer Spektren von verdünnten wäßrigen Lösungen ermöglicht. Ferner ist ein Zentrifugal-Trockengerät gebaut worden, indem sich hydratisierte Schichten der Probensubstanz reproduzierbar herstellen lassen. Einige allgemeine Fehlerquellen der quantitativen IR Messung werden diskutiert, insbesondere ist gezeigt, welche Fehler auftreten können, wenn die Schichtdicke der Probe über den Strahlquerschnitt hinweg nicht konstant ist.

3. Die Beobachtung von Einzelsystemen der bei der Hydrolyse hauptsächlich entstehenden Moleküle lehrt, bei welchen ionalen Bedingungen die einzelnen Gruppierungen im IR Spektrum erscheinen. Sie zeigt weiter, welche Gruppierungen stark polarisierbare H^+ Brücken ausbilden und macht damit die Verhältnisse bei der Hydrolyse durchschaubar.

4. Zunächst wurden in den Einzelsystemen K_3PO_4, Na_3ADP, Na_4ATP die Kationen schrittweise durch Protonen ersetzt und die Protonierung verfolgt. Von den Salzen des ADP und ATP

wurden auch hydratisierte Schichten gemessen. Die wesentlichen Ergebnisse sind:

a) Das PO_4^{3-} Ion liegt entsprechend der Protonierung in einer Reihe von verschiedenen Gruppierungen vor. Dabei treten verschiedene stark polarisierbare H^+ Brücken auf. Bei 150% Protonierung werden $POH^+ \cdots OP$ Brücken gebildet.

b) In den wäßrigen Lösungen von ADP und ATP verläuft die Protonierung entsprechend den pK_a Werten an Phosphatketten und Basenrest. Dagegen werden in hydratisierten Schichten die Akzeptoren parallel besetzt. Die beobachtete Kontinuumsabsorption ergibt sowohl im Fall der Lösung als auch in dem der Schicht, daß am Basenring und am endständigen Phosphat stark polarisierbare H^+ Brücken gebildet werden.

5. Beim Mg KADP in wäßriger Lösung wurde wiederum schrittweise das K^+ durch H^+ ersetzt. Der Komplex bindet das Proton nur am Phosphat und bildet dabei in sehr geringem Umfang polarisierbare Wasserstoff-Brücken aus.

6. Wenn der Mg ADP Komplex und das PO_4^{3-} Ion im Verhältnis $Mg^{2+}:Mg^{2+}:PO_4^{3-}:ADP^{3-}=1:1:1$ in wäßriger Lösung vorhanden sind, verläuft die Protonierung entsprechend den pK_a Werten der anwesenden Akzeptoren. Wenn das PO_4^{3-} Ion 150% protoniert ist, wird wie im PO_4^{3-} Einzelsystem die Ausbildung vom $POH^+ \cdots OP$ Brücken beobachtet.

7. Es wurden nun Spektren während der spontanen Hydrolyse vom MgK_2ATP, $MgK_{0\,3}H_{0\,7}$ ATP und Mg KHATP in 0,3 M wäßriger Lösung aufgenommen. Ihre Auswertung ergab folgendes:

a) Die Protonenakzeptorstärken der verschiedenen Ionen sind aneinander angeglichen. Insbesondere liegt die des PO_4^{3-} Ions in der Größenordnung von der der endständigen Phosphatgruppen von ADP und ATP. Die Akzeptorstärke des PO_4^{3-} Ions ist nicht konstant.

b) Es werden stark polarisierbare $POH^{+}\cdots O$ Brücken zwischen den abgelösten Phosphationen gebildet, wenn diese 150% protoniert sind. Ebensolche Brücken treten zwischen den Basenresten der Adenosinphosphate auf; eine Entscheidung, um welche Adenosinphosphate es sich handelt, ist nicht in jedem Falle möglich.

c) Das Auftreten der in b) beschriebenen Wasserstoff-Brücken ist den jeweiligen Hydrolysegraden gut zuzuordnen.

d) Eine extreme Aenderung der Hydratstruktur ist in sehr engen Hydrolysebereichen zu beobachten. Dieser Effekt ist aus den Ergebnissen der Einzelspektren nicht zu erklären. Eine Deutung in molekularen Vorstellungen ist hier noch nicht möglich.

Literatur

(1) G.Zundel: "Hydration and Intermolecular Interaction"; Academic Press, New York 1969
(2) G.Zundel und A.Murr: Electrochim.Acta 12, 1147 (1967)
(3) G.Zundel und H.Metzger: Z.physik.Chem.NF 58, 225 (1968)
(4) I.Kampschulte-Scheuing und G.Zundel: J.physic.Chem. 74, 2363 (1970)
(5) W.Sessler und G.Zundel: Z.physik.Chem.NF 79, 180 (1972)
(6) W.Sessler und G.Zundel: Chem.Phys.Letters 14, 356 (1972)
(7) G.Zundel und J.Mühlinghaus: Z.Naturforschg. 26b, 546 (1971)
(8) J.Mühlinghaus und G.Zundel: Biopolymers 10, 711 (1971)
(9) E.G.Weidemann und G.Zundel: Z.Naturforschg. 25a, 627 (1970)
(9a) R.Janoschek, E.G.Weidemann, H.Pfeiffer und G.Zundel: J.Amer.Chem.Soc. 94, 2387 (1972)
(10) E.G.Weidemann und G.Zundel: Z.Physik 198, 288 (1967)
(10a) J.C.Rüegg: Vortrag in München 1971
(11) J.Mühlinghaus: Dissertation Universität München 1970
(12) W.D.Lubos: Dissertation Universität München 1970
(13) R.M.Bock, Nan-Sing Ling, S.A.Morell und S.H.Lipton: Arch.Biochem.Biophys.62, 253 (1956)
(14) M.E.Heyde und L.Rimai: Biochemistry 10, 1121 (1971)
(14a) T. Funck, Göttingen, persönliche Mitteilung
(15) I.Kampschulte-Scheuing: Dissertation, Universität München 1969
(16) E.F.Rissman: J.Anal.Chem. 44, 644 (1972)
(17) G.Papakostidis, Dissertation, Universität München 1972
(18) R.P.Young und R.N.Jones: Chem.Rev. 71, 219 (1971)
(18a) D.Schiöberg, München, persönliche Mitteilung
(19) Testfibel der Firma Boehringer, Mannheim 1971
(20) Biochemisches Taschenbuch; Hrsg. H.M.Rauen, Springer-verlag Berlin, 2. Aufl. 1964
(21) R.Suhrmann und F.Breyer: Z.physik.Chem. B23, 193 (1933)
(22) Th.Ackermann: Z.physik.Chem.NF 41, 114 (1964)
(23) G.Zundel und H.Metzger: Z.Naturf. 22a, 1412 (1967)
(24) G.Zundel, H.Voller und G.M.Schwab: Z.Elektrochem. 66, 129 (1962)

(25) G.Zundel und G.M.Schwab:J.physic.Chem.67, 771 (1963)
(26) Th.Ackermann, K.Zwernemann und G.Zundel: Z.physik. Chem.NF 49, 331 (1966)
(27) E.Steger und K.Herzog: Z.anorg.allg.Chemie 331, 169 (1964)
(28) A.C.Chapman und L.E.Thirwell: Spectrochim.Acta 20, 937 (1964)
(29) R.Phillips: Chem.Rev. 66, 501 (1966)
(30) K.Kölkenbeck, Dissertation Universität München 1972
(31) A.Epp, T.Ramasarma und L.R.Wetter: J.Amer.Chem.Soc. 80, 724 (1958)
(32) H.Brintzinger: Helv.Chim.Acta 48, 47 (1965)
(33) K.Burton und H.A.Krebs: Biochem.J. 55, 94 (1953)
(34) A.E.Martell und S.Schwarzenbach: Helv.Chim.Acta 39, 653 (1956)
(35) R.M.Smith und R.A.Alberty: J.Amer.Chem.Soc. 78, 2376 (1956)
(36) S.Weitzel und T.Spehr: Z.physiol.Chem. 313, 212 (1958)
(37) K.Hotta, J.Brahms und M.F.Morales: J.Amer.Chem.Soc. 83, 997 (1961)
(38) M.M.Taqui Khan und A.E.Martell: J.Amer.Chem.Soc. 84, 3037 (1962)
(39) W.J.O'Sullivan und D.D.Perrin: Biochim.Biophys.Acta 52, 612 (1961)
(40) K.Burton: Biochem.J. 71, 388 (1959)
(41) S.Watanabe, T.Trosper, M.Lynn und L.Evanson: Biochem.J. 54, 17 (1963)
(42) M.E.Heyde und L.Rimai: Biochem. 10, 1121 (1971)
(43) M.M.Taqui Khan und A.E.Martell: J.Amer.Chem.Soc. 88, 668 (1966)
(44) R.M.Izatt, J.J.Christensen und J.H.Rytting: Chem.Rev. 71, 439 (1971)
(45) L.Rimai, M.E.Heyde und E.B.Carew: Biochem.Biophys.Res. Comm. 38, 231 (1970)
(46) E.Walaas: Acta Chem.Scand. 12, 528 (1958)

(47) C.R.Gaucher und J.F.Taylor: J.biol.Chem. 239, 2251 (1964)
(48) J.A.Happe und M.Morales: J.Amer.Chem.Soc. 88, 2077 (1966)
(49) M.Cohn und T.R.Hughes: J.biol.Chem. 237, 176 (1962)
(50) G.G.Hammes und D.L.Miller: J.chem.Phys. 46, 1533 (1967)
(51) H.Sternlicht, R.G.Shulman und E.W.Anderson: J.chem.Phys. 43, 3133 (1965)
(52) T.A.Glassman, C.Cooper, L.W.Harrison und T.J.Swift: Biochem. 10, 843 (1971)
(53) D.Perahia, B.Pullman und A.Saran: Biochem.Biophys.Res. Comm. 47, 1284 (1972)
(54) H.Brintzinger: Biochim.Biophys.Acta 77, 343 (1963)
(55) H.Brintzinger: J.Amer.Chem.Soc. 87, 1805 (1965)
(56) R.M.Smith und R.A.Alberty: J.phys.Chem. 60, 180 (1956)
(57) P.George und R.L.Rutman: Progr.Biophys. 10, 1 (1960)
(58) P.George, R.J.Witonsky, M.Trachtman, C.Wu, W.Dorwart, L.Richman, W.Richman, F.Shurayh und B.Lenz: Biochim. Biophys.Acta 223, 1 (1970)
(59) L.Rimai und M.E.Heyde: Biochem.Biophys.Res.Comm. 41, 313 (1970)
(60) G.Weitzel und T.Spehr: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 313, 212 (1958)
(61) Handbook of Chemistry and Physics; 44.Ed.Chem.Rubber Publ.Co. Cleveland/Ohio 1963
(62) J.J.Fox und A.E.Martin: Proc.Royal Soc.London Ser.A 174, 234 (1940)
(63) P.A.Giguère und K.B.Harvey: Canad.J.Chem. 34, 798 (1956)
(64) R.P.Young und R.N.Jones: Canad.J.Chem. 47, 3463 (1969)
(65) S.B.Sachs, A.Raziel, H.Eisenberg und A.Katchalsky: Transact.Faraday Soc. 65, 77 (1969)
(66) G.A.Vidulich, D.F.Evans und R.L.Kay: J.phys.Chem. 71, 656 (1967)
(67) S.Katz, W.W.Bach und W.A.Reiche: Anal.Chem. 41, 1270 (1969)
(68) T.Funck, Göttingen, persönliche Mitteilung
(69) B.Curnutte und J.Bandekar: J.Mol.Spectr. 41, 500 (1972)
(70) J.B.Bryan und B.Curnutte: J.Mol.Spectr. 41, 512 (1972)

(71) E.M.Bradbury, W.C.Price und G.R.Wilkinson: J.Mol. Biol. 3, 301 (1961)

(72) E.M.Bradbury, W.C.Price und G.R.Wilkinson: Anal.Chem. 44, 644 (1972)

Lebenslauf

Am 14.Dezember 1943 wurde ich in Lindau/Bodensee geboren. Meine Eltern sind Dr. Max Hofmann, Ministerialdirigent und Emmy Hofmann, geb. Tretter, Gewerbelehrerin. Ich bin das einzige Kind meiner Eltern. Im Jahre 1945 kam ich nach München.

Von September 1949 bis Juli 1953 besuchte ich dort die Werdenfels-Schule.

Im September 1953 trat ich in das Wittelsbacher Gymnasium ein, 1962 bestand ich die Reifeprüfung in der humanistischen Abteilung.

Von Oktober 1962 an studierte ich Physik an der Universität München. Mit der Diplomarbeit begann ich im Februar 1967 in der Sektion Physik bei Prof. Rollwagen. Im Juli 1969 legte ich die Diplomhauptprüfung ab.

Von September 1969 an fertigte ich bei Dr.Zundel im Institut für Physikalische Chemie der Universität München die vorliegende Dissertation an.